

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Marija Perković

**PROŠIRENOST I MOGUĆNOST
DIJAGNOSTIKE INFEKCIJE UZROKOVANE
VRSTOM *BRUCELLA OVIS* U OVACA U
REPUBLICI HRVATSKOJ**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentor: prof. dr. sc. Zoran Milas, Veterinarski fakultet

Komentor: izv. prof. dr. sc. Boris Habrun, naslovno zvanje, Hrvatski
veterinarski institut

Članovi povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. Nenad Turk
2. prof. dr. Zoran Milas
3. izv. prof. dr. sc. Boris Habrun, naslovno zvanje
4. prof. dr. sc. Vilim Starešina, zamjena

ZAHVALA

Prije svega željela bih zahvaliti prof. dr. sc. Zoranu Milasu, predstojniku Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom i mentoru, na pristupačnosti, srdačnosti, savjetima i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Borisu Habrunu, naslovno zvanje, ravnatelju Hrvatskog veterinarskog instituta i mentoru, koji je omogućio da se ovaj rad bez ikakve naknade izradi u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti, Odjela za bakteriologiju i parazitologiju. Isto tako puno hvala na savjetima, smjernicama, potpori i korekcijama tijekom izrade rada.

Od srca zahvaljujem dr. sc. Silviju Špičiću, voditelju Laboratorija za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti, na stručnim savjetima, koji je svojim iskustvom i znanjem pomogao u kreiranju rada od materijala, metodologije do zaključaka. Hvala Vam na iznimnom strpljenju i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Posebno hvala mojim roditeljima na razumijevanju i podršci koju su mi pružali tijekom dosadašnjeg života i školovanja.

I na kraju najviše želim zahvaliti svom suprugu Luki na bezuvjetnoj podršci, beskrajnom strpljenju i stalnom ohrabrenju.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Pregled literature	3
2.1. Povijest	3
2.2. Proširenost	3
2.3. Etiologija	3
2.4. Epizootiologija	4
2.4.1. Infekcije u ovaca i ovnova	4
2.4.2. Infekcija drugih vrsta životinja vrstom <i>B. ovis</i>	6
2.5. Patogeneza	7
2.6. Klinička slika	8
2.7. Patološke promjene	8
2.7.1. Patološke promjene u ovnova	8
2.7.2. Patološke promjene u ovaca	9
2.8. Dijagnostika	10
2.8.1. Klinička dijagnostika	10
2.8.2. Serološka dijagnostika	10
2.8.3. Bakteriološka dijagnostika	11
2.8.4. Alergijski test	11
2.9. Diferencijalna dijagnoza	11
2.10. Liječenje	12
2.11. Profilaksa i suzbijanje bolesti	12
2.11.1. Stavljanje u promet životinja iz zaraženog stada:	14
2.12. Testiranje i klanje	14
2.13. Cijepljenje	15
2.14. Javno zdravstvo	15
3. Materijal i metode	16
3.1. Serološke pretrage	16
3.2. Patomorfološke pretrage	18
3.3. Bakteriološke pretrage	18
3.4. Identifikacija izolata	19
3.4.1. Dokaz pripadnosti izolata rodu <i>Brucella</i> sp. i vrsti <i>Brucella ovis</i>	19

4. Rezultati	21
4.1. Rezultati seroloških pretraga	21
4.2. Rezultati kliničkog pregleda	27
4.3. Rezultati patomorfoloških pretraga	28
4.4. Rezultati bakterioloških pretraga	29
4.5. Rezultati molekularnih pretraga	30
4.5.1. Dokaz pripadnosti vrsti <i>Brucella ovis</i>	32
5. Rasprava	34
6. Zaključci	37
7. Literatura	38
8. Sažetak	42
9. Summary	43
10. Životopis	44

1. Uvod

Brucella (B.) ovis uzrokuje kroničnu bolest ovnova i ovaca koja se naziva ovčji epididimitis, a za koju su karakteristične promjene na testisima i epididimisu ovnova te placentitis ovaca. Bolest je raširena u zemljama sa razvijenim ovčarstvom, poput Australije, Novog Zelanda, Sjeverne i Južne Amerike, Južne Afrike i mnogim zemljama u Europi. Procjenjuje se da uzrokuje znatne ekonomske gubitke u stadima ovaca gdje nema kontrole bolesti (Blasco i Marin, 1990.).

Gubici se očituju u smanjenju plodnosti ovnova, pobačajima ovaca, prijevremenom pomoru avitalne janjadi, uklanjanja oboljelih životinja iz stada i zabrani trgovine. *B. ovis* se smatra najvažnijim zaraznim uzročnikom reproduktivnih poremećaja ovaca u svijetu (Burgess, 1982., Ficipal i sur. 1998., Arsenault i sur. 2004., Petrović i sur. 2014.). Prilikom prvog dokaza bolesti u zemlji postotak inficiranih ovnova je vrlo visok i kreće se između 20–60%, a zaraženih stada od 45–75%. U zemljama s naprednim kontrolnim programima stopa pojavljivanja je znatno niža, ali je potpunu eradikaciju teško postići (Blasco i sur. 1983., Picar-Hagen i sur. 2015.).

Špičić i sur. (2009.) su prvi puta opisali zarazni epididimitis u ovnova u Republici Hrvatskoj. Bolest je kasnije dokazana u većini županija u državi (Špičić i sur. 2010.). Infekcija vrstom *B. ovis* utvrđena je u gotovo svim zemljama s ozbiljnom ovčarskom proizvodnjom. Dokazana je u nama susjednim zemljama Sloveniji (Krt, 1992.) i Srbiji (Petrović i sur. 2012. i 2014.). Infekcija vrstom *B. ovis* je dokazana i u Rumunskoj (Dobrea i sur. 2002.), Schöpf i Khaschabi (1997.), je opisuju u Austriji, Farina i sur. (1995.) u Italiji, Hold i sur. (1993.), u Švicarskoj, Ficipal i sur. (1998.), u Španjolskoj. Isto tako je opisana u Ruskoj Federaciji (Kalinovski i sur. 1995.), Ukrajini (Denes i Glavits, 1994.), Australiji (Hopkinson sur.1979., Burgess, 1982.), Novom Zelandu (Sergeant, 1994., Ridler i sur. 2014.), Kanadi (Niilo i sur, 1986., Arsenault i sur. 2004.) i u SAD-u (Bagley i sur. 1985.).

Prilikom prepoznavanja bolesti važna je brza i točna dijagnoza u cilju kontrole i suzbijanja bolesti. Zbog prolazne i kratkotrajne infekcije ovaca s *B. ovis*, kontrolne mjere usmjerene su na ovnove. Laboratorijska dijagnostika infekcije vrstom *B. ovis* razlikuje se od dijagnostike ostalih vrsta *Brucella*, a bazira na činjenici da raste samo

u »R« formi kolonija i u serološkoj dijagnostici se ne koristi isti antigen kao za dijagnostiku infekcija čiji su uzročnici druge vrste brucela poput *B. melitensis*, *B. abortus* i *B. suis*. Međutim, ne postoji idealan serološki test i sigurno je da se točna dijagnoza postavlja na osnovu izdvajanja uzročnika i njihove identifikacije. Zbog činjenice da se

visina titra protutijela za *B. ovis* u relativno kratkom roku može promijeniti i inficirane životinje postati serološki negativne potrebno je uz serološki nalaz koristiti i dijagnozu temeljiti i na kliničkom nalazu, patomorfološkim promjenama, bakteriološkom nalazu i identifikaciji uz pomoć molekularnih metoda. Lančana reakcija polimerazom je metoda koja u kombinaciji sa bakteriološkim pretragama pruža siguran dokaz za vrstu brucela.

Cilj našeg istraživanja je dokazati rasprostranjenost *B. ovis* u ovnova i ovaca u različitim regijama Republike Hrvatske. Istraživanje je vršeno u razdoblju od pet godina (od 2011. do 2015. godine) u različitim regijama u Republici Hrvatskoj. Tijekom našeg istraživanja koristili smo serološki test (reakciju vezanja komplementa), a iz materijala podrijetlom iz ovnova izdvoji uzročnika primjenom klasičnih bakterioloških postupaka. Identifikacija je vršena uz primjenu najmodernijih molekularnih metoda.

2. Pregled literature

2.1. Povijest

Godine 1952. McFarland je u Novom Zelandu, a 1953. Simonns i Hall u Australiji izdvojili su bakteriju vrlo sličanu brucelama. Na početku se smatralo da je to stabilan mutant vrste *B. melitensis*, zbog prisutnosti površinskih antigena koji su uobičajeni za R sojeve *B. abortus* i *B. melitensis*. Predložen je naziv *Brucella brucei* var. *ovis australisiae* kao nove varijante. Nova bolest tada je nazvana zarazni epididimitis ovnova, a danas se naziva »ovčji epididimitis«. Iako se ovaj uzročnik činio sličnim mikrobima roda *Neisseria* i *Haemophilus*, uskoro se pokazalo da je 94% homologan drugim vrstama u roda *Brucella*. Kasnije (1956.) je bakterija preimenovana u *B. ovis* i postala je nova vrsta roda brucela (Burgess, 1982.) .

2.2. Proširenost

Bolest se pojavljuje u svim zemljama u kojima se uzgajaju ovce. Zabilježena je u Novom Zelandu, Australiji, SAD-u, Kanadi, u Južnoj Americi (Meksiku, Argentini, Urugvaju, Peruu, Čileu, Brazilu) Rusiji, središnjoj Aziji i južnoj Africi. Dokazana je i u mnogim europskim zemljama (Španjolska, Francuska, Italija, Njemačka, Mađarska, Slovačka, Češka, Rumunjska, Bugarska i Srbija). Procjenjuje se da bolest može nanijeti velike gospodarske gubitke ovčarskoj proizvodnji. Kada se bolest prvi put dijagnosticira u nekoj zemlji njezina učestalost u stadima može biti do 75%, a zaraženo može biti više od 60% ovnova. U Hrvatskoj je bolest opisana 2006. godine. Proširena je po cijeloj Hrvatskoj a osobito u županijama u kojima se ovce najviše uzgajaju (Špičić i sur. 2009.).

2.3. Etiologija

B. ovis je gram-negativni bacil ili kokobacil, duljine od 0,7 do 1,2 µm i širine od 0,5 do 0,7 µm. U razmasku se nalazi pojedinačno, rjeđe u parovima i kratkim nizovima. Nepokretna je, nema kapsulu, ne tvori spore i ne boji se bipolarno. *B. ovis* raste na čvrstim hranjivim podlogama (krvni agar, Columbia agar, triptoza soja agar i sl.), koje sadrže različite aminokiseline, tiamin, nikotinamid i magnezijeve ione. Rast pospješuje dodatak 5 do 10% seruma ili krvi. Za selektivno izdvajanje može se rabiti Thayer-Martinova selektivna hranjiva podloga. Za primarno izdvajanje potrebno je 10% CO₂ u atmosferi, iako se mogu izdvojiti i sojevi kojima za rast nije nužna povećana

koncentracija CO₂. Kolonije su vidljive nakon 3 do 5 dana inkubacije pri 34 do 37 °C. Rast je vidljiv i na temperaturi od 27 °C, ali kolonije se pojavljuju nešto kasnije, za šest do deset dana. Na hranjivim podlogama koje sadrže krv ne stvara hemolizu. Kolonije su okrugle, konveksne, punog ruba i hrapave »R« (engl. *rough*). Pri rutinskoj identifikaciji koristi se nekoliko biokemijskih testova. Za *B. ovis* karakteristično je da tvori ureazu, ne reducira nitrat u nitrit, tvori katalazu, ne tvori citokin oksidazu i ne stvara H₂S. *B. ovis* oksidira L-alanin, D-alanin, L-asparagin, D-asparagin, L-glutaminsku kiselinu, D-serin i adonitol. Ne oksidira L-arabinozu, D-galaktozu, D-glukozu, D-ribozu, D-ksilozu, L-arginin, D-citrulin, L-ornitin ili L-lizin. Pojedini bakteriofagi specifično liziraju određenu vrstu brucela. U rutinskoj fagotipizaciji koristi se pet skupina faga, Tb (Tbilisi), Wb (Weybridge), Fi (Firence), BK (Berkeley) varijantama BkO, Bk1, Bk2 i R fag s varijantama R7O, R/C i R/M. Za *B. ovis* karakteristično je da je liziraju samo fagi R7O i R7C u RTD (engl. *routine test dilution*, RTD) ili 10⁴ x RTD. Nije poznat ni jedan biovar *B. ovis* (Cvetnić, 2015.).

2.4. Epizootiologija

2.4.1. Infekcije u ovaca i ovnova

Iako pojava te zaraze varira, infekcija vrstom *B. ovis* se javlja diljem svijeta, a osobito u zemljama koje se bave ovčarskom proizvodnjom. Kad se bolest prvi put otkrije u nekoj zemlji, njezina je pojava ujednačeno visokog stupnja, s 20 do 60% zaraženih ovnova i 45 do 75% zaraženosti stada. U zemljama s naprednim kontrolnim programima stopa pojava je znatno manja, ali je potpunu eradikaciju izuzetno teško postići.

Pojava bolesti ovisi o načinu infekcije, infektivnoj dozi, dobi, pasmini i spolu. *B. ovis* izlučuje se sjemenom, plodovim ovojnica, mlijekom i pobačenim plodovima. Ovnovi su stalan izvor zaraze i najvažniji su za prijenos bolesti. Glavni put širenja je spolni prijenos preko rasplodnih ženki. Prenosi se koitusom s ovna na ovcu, a može se prenijeti s ovna na ovna, izravnim dodirima s bolesnim ovnovima ili nakon useljavanja ovnova u nastambe u kojima su prije boravile zaražene životinje. Može se prenositi i zaskakivanjem mladih ovnova jednih na druge, a prenošenju infekcije mogu pogodovati rane koje nastanu tijekom striženja. Nekontrolirani prirodni pripust također može pogodovati brzom širenju bolesti. Bolest se u zdravo stado često unosi nabavom zaraženih ovnova koji služe za obnovu stada. Ovnovi šire bolest u stadu tijekom prirodnog parenja, prilikom razmjene ili posudbe ovnova. Onečišćeno zemljište (pašnjak), transportna sredstva, hrana i voda nisu važni u širenju ovčjeg epididimitisa (Blasco, 1990.).

B. ovis se izdvaja u ovaca iz vaginalnog iscjetka deset dana nakon pobačaja. Ovnovi se najčešće inficiraju prilikom spolnog čina i to najčešće tijekom prvog estrusa nakon pobačaja. Na infekciju su osobito osjetljivi mladi ovnovi, a spolnim sazrijevanjem ovnova njihova podložnost prirodnoj infekciji veća je kao i pojava klinički vidljivih promjena na testisima. Infekcija vrstom *B. ovis* dovodi do aspermije i smanjene pokretljivosti spermija i u ovnova u kojih kliničke promjene na testisima nisu vidljive, a svaki zaraženi ovan ne izlučuje *B. ovis* sjemenom (Burgess, 1982., Bulgin i Anderson, 1983.).

Za razliku od ovnova, ovce su prilično otporne na infekciju. Nakon parenja sa zaraženim ovnom samo se ponekad u ovaca može razviti bolest čija je posljedica pobačaj, janjenje mrtve ili avitalne janjadi. U pokusno izazvane infekcije u gravidnih ovaca primijećene su slične promjene. Dijaplacentni i galaktogeni prijenos infekcije nije značajan. Janjad što ih ojanje inficirane ovce rijetko razviju zarazu, pa čak i kad posišu zaraženo mlijeko. Infekcija se rijetko nastavlja u ovaca iz jedne gravidnosti u drugu. Može se zaključiti da je uloga ovaca u aktivnom prijenosu zaraze vrstom *B. ovis* manje važna. U stadima gdje se pojavljuju pobačaji uzrokovani vrstom *B. ovis*, broj živorođene janjadi može se smanjiti za četvrtinu, dok 16% janjadi ugiba do šestog tjedna starosti, a 20% ovaca ostaje neplodno. Pokazalo se da infekcije ovaca vrstom *B. ovis* uzrokuje smanjuje stopu janjenja i do 30% u novo inficiranim stadima, a 15 do 20% u stadima u kojima je bolest trajno prisutna (Blasco, 1990., Bulgin, 1990.).

U pokusnim uvjetima uspješno zaražavanje ovnova može se postići raznim načinima: oralnim, intravenskim, intratestikularnim, konjunktivalnim, intraprepucijskim, supkutanim, kroz lezije na koži, intrarektalno i intranazalno. Najuspješnijima su se pokazale konjunktivalna i intraprepucijska infekcija i njihova istodobna primjena. Doze od 5×10^8 do 10^9 CFU *B. ovis* dovoljne su za postizanje stope infekcije od gotovo 10%. Izlučivanje *B. ovis* sjemenom inficiranih ovnova može trajati najmanje dvije godine. U prirodno inficiranih ovnova dokazano je da čak 50% ima slabiju kvalitetu sjemena od uobičajene. U ovaca koje su bile pokusno inficirane intravenski, transkonjunktivalno i preko sluznice rodnice može uslijediti sporadične uginuća plodova u dobi od 40. dana gravidnosti te janjenje mrtve ili avitalne janjadi. Nakon pokusne vaginalne infekcije ovaca između 5. i 40. dana gravidnosti *B. ovis* je bilo moguće izdvojiti iz rodnice nakon 64 dana, a iz krvi 98 dana nakon pokusne infekcije.

Utječe li dob na primljivost za infekciju često je predmet rasprave. Infekcija je dokazana u četveromjesečnih ovnova, što pokazuje na to da su životinje prije spolne zrelosti prijemčljive na *B. ovis*. Poznato je da je spolni prijenos glavni način širenja ovčje

bruceloze, stoga su odrasle, spolno zrele životinje podložnije prirodnom zaražavanju. Također, dokazano je da je pojava patoloških promjena na testisima i učestalost bruceloze proporcijalna s dobi, a povezana je sa spolnom aktivnošću životinja. Stanovitu ulogu ima i pasminska osjetljivost. U istom okolišu ovce merino pasmina rjeđe se zaražavaju od britanskih pasmina. Uočeno je da su domaće (autohtone) pasmine otpornije od uvezenih. Statistički, domaća španjolska pasmina i merino otpornije su na ovčju brucelozu od drugih uvoznih europskih pasmina. Iako genska otpornost na bolest može biti važna, treba istaknuti činjenicu da primijećljivost može biti povezana i s brzinom rasta, spolnom zrelošću i aktivnošću (Carvalho Júnior i sur. 2011.).

2.4.2. Infekcija drugih vrsta životinja vrstom *B. ovis*

Vrsta *B. ovis* dokazana je isključivo u ovaca, a osobito napada ovnove. Iako su neke serološke pretrage upućivale na mogućnost zaražavanja i ljudi, nema izvještaja o izdvajanju *B. ovis* iz čovjeka.

Intratestikularna inokulacija infektivnog materijala najčešće se očituje epididimitisom. *B. ovis* je moguće izdvojiti dva do tri mjeseca nakon infekcije iz različitih organa kao što su jetra, slezena, limfni čvorovi i bubrezi.

U pokusnoj infekciji jarčeva vrstom *B. ovis* dolazi do naseljavanja u spolnim organima nekih životinja te do posljedičnog razvoja lezija sličnih onima primijećenih u ovnova. U ekstenzivnim uzgojima koze i ovce često se drže zajedno te se bolest lako može prenijeti s ovaca na koze i obratno. Izdvajanje *B. ovis* iz prirodnih slučajeva infekcije u koza nikad nije dosada zabilježena. Postoje podaci o infekciji krava s *B. ovis* u petom mjesecu gravidnosti, ali nije došlo ni do kakvih poremećaja u inficiranih krava osim što je u jedne uzročnik izdvojen iz mlijeka. Prirodna infekcija utvrđena je u bjelorepog jelena (*Odocoileus virginianus*). Infekcija vrstom *B. ovis* dokazana je i na farmi crvenih jelena. Inficirani jeleni izlučuju uzročnika sjemenom, ali se u većine zaraza okonča nakon godinu dana čime prestaje izlučivanje uzročnika. Do infekcije dolazi spolnim putem ili izravnim dodirnom. *B. ovis* je izdvojena iz mokraćnog mjehura i bubrega zaraženih jelena (Cvetnić, 2015.).

Izvedeni su pokusi na različitim vrstama laboratorijskih životinja. Male laboratorijske životinje inficiraju se na razne načine s dozama koje se kreću od 10^4 do 10^{11} CFU s različitim uspjehom. Iako su korišteni kunići, štakori, hrčci, miševi i zamorčad, još nije pronađen zadovoljavajući laboratorijski životinjski model za infekciju vrstom *B. ovis* (Blasco, 1990.).

2.5. Patogeneza

Kao i kod infekcija uzrokovanih drugim vrstama brucela, postoji relativno duga inkubacija prije pojave kliničkih znakova. Brucele su uzročnici koji se razmnožavaju u stanicama retikuloendotelnog sustava što određuje patogenezu i kliničku sliku bolesti. Cijeli proces ovisi i o virulenciji soja i infektivnoj dozi, prijemljivosti, spolu, reprodukcijom statusu, imunosti i dobi životinje. Ulazna vrata su najčešće sluznica spolnog, zatim probavnog i dišnog sustava, rjeđe ozlijeđena kože i konjunktive.

Nakon ulaska u organizam brucele dopiru u limfni i krvni optok. Susreću se s obranom domaćina i uglavnom dopiru do regionalnih limfnih čvorova. Na mjestu ulaska može doći do upalne reakcije i razvoja regionalnog limfadenitisa. U pokusima je dokazano da bakterije ostaju ograničene na limfne čvorove u blizini mjesta ulaska tijekom dva do tri tjedna, a zatim se razvija bakterijemija, nakon koje slijedi infekcija retikuloendotelnog sustava, limfnih čvorova udaljenih od mjesta infekcije, spolnih organa i sekundarnih spolnih žlijezdi. Iz pokusno inficiranih ovnova bakterije su izdvojene iz jetara, bubrega, slezene, testisa, epididimisa, vezikularnih žlijezda, bulbouretralnih žlijezda te ilijačnih, preskapularnih, submaksilarnih, parotidnih i retrofaringealnih limfnih čvorova. Ciljni organi su epididimis i sekundarne spolne žlijezde. Zbog toga većina zaraženih ovnova izlučuje brucele sjemenom. Kod serološki pozitivnih životinja s negativnim bakteriološkim nalazom, bakterije mogu biti smještene i u drugim organima, osim onih u kojima se stvara sjeme. Ova hipoteza u skladu je s izdvajanjem *B. ovis* iz slezene i ilijačnih limfnih čvorova nekih pokusno zaraženih životinja u kojih se bakterije nisu mogle izdvojiti iz spolnih organa i sekundarnih spolnih žlijezda (Blasco i sur. 1983.).

Uz početnu lokalizaciju u epididimisu pojavljuje se i perivaskularni edem i infiltracija limfocita, monocita i neutrofila te peritubularnog tkiva. Nakon toga se u upaljenom tubularnom epitelu razvije papilarna hiperplazija i lokalna hidropična degeneracija te kasnije tvorbe intra epitelne ciste. Moguće propadanje epitela uzrokovano bakterijama dovodi do tvorbe velikih spermatozoidnih granuloma, koji dovode do degeneracije epididimisa, testisa i fibroze (Marin i sur. 1989.).

Patogeneza *B. ovis* u ovaca nije u potpunosti razjašnjena. U gravidnih životinja, zbog razmnožavanja brucela u tkivu embrija i trofoblastima posteljice nastaje placentitis. Placentitis najčešće dovodi do slabije ishranjenosti ploda i janjad se ojanji slaba i avitalna, rjeđe dolazi do uginuća ploda i pobačaja. Ovce pokusno izložene *B. ovis* bilo prije parenja ili u kasnoj trudnoći ne pobacuju. Samo ovce izložene u ranoj ili u sredini trudnoće mogu eventualno pobaciti (Špičić, 2005., Petrović, 2012., Cvetnić, 2015.).

2.6. Klinička slika

B. ovis uzrokuje kliničku ili supkliničku bolest kroničnog tijeka. U ovnova se očituje promjenama na testisima, a u ovaca placentitisom. Kronične promjene imaju za posljedicu slabiju plodnost ili neplodnost ovnova, janjenje slabije avitalne janjadi i pobačaje ovaca. Inficirani ovnovi imaju slabiju kvalitetu sjemena i smanjenu plodnost, a u ovnova s povećanim testisima uvelike je smanjena ukupna koncentracija i udio vitalnih spermija. Katkad se i u ovnova bez palpatorno uočljivih patoloških promjena nalazi sjeme slabije kvalitete. Promjene na testisima uglavnom su jednostrane, testis i epidimis razlikuju se po veličini i obliku. Epididimis se može povećati, a testis atrofirati. Promjene ovise i o starosti procesa. Glavni znakovi bolesti kod ovnova su epididimitis, rjeđe orhitis. Klinički se takve promjene mogu ustanoviti palpacijom i adspekcijom testisa i epididimisa. Vidljiva je i asimetrija skrotuma, uvećanje epididimisa i/ili testisa. Promjene na epididimisu prvo zahvate rep, koji može biti povećan do veličine kokošjeg jajeta. Tijelo i glava epididimisa mogu biti povećani, dok testis obično atrofira zbog pritiska uvećanog epididimisa (Špičić, 2005.).

Klinička dijagnoza postavljena na osnovi palpacije i adspekcije testisa i epididimisa nije pouzdana, jer smatra se da samo oko 50% ovnova zaraženih vrstom *B. ovis* ima epididimitis. U životinja u kojih se palpacijom utvrdi epididimitis, za nekoliko tjedana može biti normalna klinička slika. Kasnijim se patohistološkim pretragama mogu dokazati promjene. Katkad je vidljiva asimetrija skrotuma (Petrović, 2012., Picard-Hagen i sur. 2015.).

U ovaca do pobačaja dolazi samo u slučaju obimnog placentitisa, nekroze posteljice i njezinog ljuštenja od karunkula. Uzrok je manjkava prehrana ploda i pobačaj se javlja u zadnjoj trećini gravidnosti. Blaži oblici infekcije ne završavaju pobačajem nego janjenjem avitalne janjadi, a što je uzrokovano slabijom ishranom tijekom gravidnosti i placentitisa (Blasco i Marin, 1990.)

2.7. Patološke promjene

2.7.1. Patološke promjene u ovnova

Najčešća patološka promjena u ovnova jest specifični epididimitis. Promjene se nalaze na repu, rjeđe u tijelu i glavi epididimisa. Iako *B. ovis* uzrokuje epididimitis, u nekih se zaraženih ovnova epididimitis ne može otkriti palpatorno. U jednom pokusu provedenom na 267 serološki pozitivnih ovnova, samo u 125 (46,8%) moglo se samo palpacijom ustanoviti povećanje testisa. U većini slučajeva i promjena na testisima

se nalazi samo na jednom testisu. Najčešće je zahvaćen rep epididimisa, a često su zaraženi glava i tijelo epididimisa (Blasco i sur. 1983.).

U akutnom obliku bolesti javlja se edem epididimisa i serofibrozni gnojni eksudat u *cavum vaginale*. Pri težem akutnom obliku zbog edema skrotuma i proširenosti sjemenih kanalića dolazi do povećanja cijelog testisa. Atrofija testisa i povećanje repa epididimisa različitog stupnja karakteristični su za kroničnu fazu bolesti. Testisi su čvrste konzistencije s hipertrofijom repa epididimisa. Makroskopski izgled testisa obično je normalan, ali se presjekom površine mogu zamijetiti nekrotični čvorići, granulomi i kalcifikacije. Zbog proliferacije vezivnog tkiva epididimitis je na presjeku bijele boje. Na debelom vezivnom tkivu često se pronalaze jedan ili više apscesa sličnih spermatocelima ispunjenih kremastim ili sirastim sadržajem (Rahaley i Dennis, 1984.).

Ovojnice testisa su zadebljale, mogu se uočiti fibroze, a između parijetalnog i visceralnog lista nastaju adhezije. Opisane promjene posljedica su spermatocela, koje predstavljaju retencijske ciste u kojima se nalaze spermatozoidi, a nastaju kao posljedica suženja ili začepljenja sjemenih kanala u kroničnoj fazi bolesti. Često se nalaze hemoragične i eksudativne upale kao rezultat puknuća lezije (spermatocele) epididimisa. Organizacija eksudata stvara priraslice između dva sloja *tunicae vaginalis*. Na bulbouretralnim žlijezdama, prostati i ampulama obično se ne uočavaju nikakve makroskopske promjene (Marin i sur. 1989.).

2.7.2. Patološke promjene u ovaca

Patološke promjene u ovaca povezane su s činjenicom da *B. ovis* u gravidnih ovaca uzrokuje pobačaj. Pokusnom infekcijom gravidnih ovaca dokazano je da je nakon bakterijemije slijedila lokalizacija uzročnika u placentomima, što je uzrokovalo endometritis. U ovaca se nalaze karakteristične degenerativne i upalne promjene endometrija s lokalnom ili difuznom limfoidnom infiltracijom. U teškim slučajevima razvija se gnojno-nekrotični endometritis. Pobačeni plodovi su edematozni, a najčešće se edemi mogu uočiti u potkožnom tkivu, osobito u pupčanom području. U perikardu, grudnoj i trbušnoj šupljini može se naći serozni crvenkasti sadržaj. Moguća su točkasta krvarenja na serozama želuca, crijeva i mokraćnog mjehura. U želucima plodova nalazi se sluzava masa prozirne ili žućkaste boje (Mayer, 1982., cit. Špičić, 2005.).

U zaraženih ovaca vidljiv je žućkasti gnojni eksudat koji varira od male količine na površini netaknute korioalantoisne membrane, do obilne količine koja ispunjava područja unutar posteljice. Eksudat sadrži bakterije, makrofage, neutrofile i oljuštene

epitelne stanice. Kod teških oblika bolesti često se zamjećuje fibroza, zadebljanje i edemi korioalantoisne membrane. Na kotiledonima se mogu ustanoviti različiti stadiji nekroze. Epitelne stanice koriona mogu biti povećane i sadržavati bakterije. Često se zamjećuje žarišna nekroza kotiledona i epitela koriona. Uobičajene su lezije arterija, koje se očituju povećanim endotelnim stanicama i proliferativnim stanicama *tunicae intima*, a ispunjene su fibroznim trombima.

U pobačenim plodovima histološki se nalazi peribronhijalna limfoidna infiltracija, alveolarni edem i infiltracija mononuklearima, limfadenitis bronhijalnih i medijastinalnih limfnih čvorova (Blasco, 1990.).

2.8. Dijagnostika

U dijagnostici bruceloze uzrokovane vrstom *B. ovis* u ovaca istodobno se služimo s više različitih dijagnostičkih metoda. Dijagnoza se najčešće postavlja na temelju kliničkih, seroloških, bakterioloških i molekularnih pretraga.

2.8.1. Klinička dijagnostika

Svaka pojava epididimitisa, pobačaja, janjenja mrtvorođene i avitalne janjadi ili manjeg broja ojanjene janjadi u usporedbi s prijašnjim godinama pobuđuje sumnju na infekciju uzrokovanu vrstom *B. ovis*. Konačnu dijagnozu nije moguće postaviti samo palpacijom i utvrđivanjem rezultata plodnosti ovnova. Zaraženi ovnovi u kojih se palpacijom ustanovi epididimitis često su nakon nekoliko tjedana, pregledani na jednak način pokazalo da su klinički zdravi.

Inficirani ovnovi imaju slabu kvalitetu sjemena i smanjenu plodnost. U ovnova s povećanjem testisa znatno je smanjena ukupna koncentracija i udio vitalnih spermija. Zaraženi ovnovi u kojih se ne može palpacijom utvrditi epididimitis mogu imati sjeme slabe kvalitete. Budući da klinički znakovi nisu uvijek jasni, a zaraženi ovnovi često zadržavaju određen stupanj plodnosti, nije moguće postaviti konačnu dijagnozu samo palpacijom skrotuma i utvrđivanjem rezultata plodnosti ovnova (Livingstone, 1964., Bulgin i Anderson, 1983.).

2.8.2. Serološka dijagnostika

Sumnja na brucelozu ovaca uzrokovanu vrstom *B. ovis* osim na temelju kliničke slike najčešće se postavlja serološkim pretragama. Ne postoji idealan serološki test

i prilikom procjene dobivenih rezultata treba uzeti u obzir specifičnost i osjetljivost rabljenog testa. Za otkrivanje prisutnosti protutijela najčešće se koriste reakcija vezanja komplementa (RVK) i imunoenzimni test (ELISA), a ranije se koristio i agar gel-difuzijski test (AGID). Za serološku dijagnostiku važan je humoralni imunosni odgovor. Nakon infekcije brucelama prvo se javljaju protutijela razreda IgM, najranije prvog tjedna nakon infekcije, a mogu se dokazati četvrtog tjedna i kasnije. U pokusnim uvjetima prva protutijela imunoenzimskim testom ustanovljena su 11. dana, a titar IgM protutijela povećava se do 33. dana nakon infekcije. Najviši titar doseže se 41. dan. Nakon tvorbe IgM protutijela, slijede IgG₁ i IgG₂ s višim titrom (Marin i sur. 1989., Ficpial i sur. 1998.).

2.8.3. Bakteriološka dijagnostika

Za bakteriološku pretragu uzima se sperma, obrisak sluznice rodnice i mlijeko. Uzorci sjemena najčešće se uzimaju iz prepucijske šupljine nakon elektro ejakulacije. Sjeme se može uzeti iz rodnice ovce odmah nakon parenja. Prilikom razudbe za izdvajanje *B. ovis* u ovnova najčešće se uzima epididimis, sjemene vrećice, ampule i ingvinalni limfni čvorovi. Kod pobačenih plodova najčešće se uzima sadržaj želuca i parenhimski organi. Nakon prikupljanja uzorci se u najkraćem mogućem roku dostavljaju do laboratorija ohlađeni na +4 °C ili zamrznuti.

2.8.4. Alergijski test

Intradermalni brucelinski test je vrlo osjetljiv. Temelji se na reakciji preosjetljivosti kasnog tipa. Nakon intrakutane aplikacije brucelina dolazi do reakcije senzibiliziranih T limfocita. Rezultati alergijskih testiranja često se ne podudaraju s rezultatima seroloških i bakterioloških pretraga. Alergijski test koristi se u kombinaciji s drugim metodama jer se na osnovi alergijskih reakcija može razlikovati da je li ovan inficiran s *B. melitensis* ili *B. ovis* (OIE, 2014.).

2.9. Diferencijalna dijagnoza

Klinički epididimitis uzrokovan drugim vrstama bakterija izuzetno otežava dijagnosticiranje infekcije vrstom *B. ovis*. Kao uzroci epididimisa u ovnova najčešće se navode sljedeći mikrobi: *Actinobacillus seminis*, *Actinobacillus actinomycetem-comitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus* spp., *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *Chlamydia psittacii* i drugi (Petrović, 2012.).

2.10. Liječenje

Bruceloza se u životinja suzbija raznim programima iskorjenjivanja, a antibiotska terapija osim epizootioloških i epidemioloških razloga nije prihvatljiva zbog velikih troškova. Postoje izvješća o uspješnoj primjeni antibiotika kod epididimitisa u ovnova zaraženih vrstom *B. ovis*. Uporabom aureomicina u kombinaciji sa streptomycinom izliječen je epididimitis i zaustavljeno izlučivanje *B. ovis* sjemenom u zaraženih ovnova, ali je kvaliteta sjemeni nakon liječenja bila i dalje loša. S druge strane, streptomycin sam ili u kombinaciji sa sulfametazinom nije se pokazao uspješnim. U drugom istraživanju, 27 od 32 zaražena ovna liječena streptomycinom i tetraciklinom bili su serološki negativni i nisu pokazivali simptome epididimitisa osam mjeseci nakon liječenja. Kombinacija oksitetraciklina produljenog djelovanja s dihidrostreptomycinom uništila je *B. ovis* iz 11 od 12 zaraženih ovnova. Suprotno tome, samo 4 od 12 životinja bilo je bakteriološki negativno kad su liječene samo s oksitetraciklinom. Mnoge životinje bakteriološki negativne nakon terapije antibioticima imale su makroskopske i histološke promjene na epididimisu i ampulama, što upućuje na nedovoljnu učinkovitost liječenja. Terapija antibioticima ne preporuča se za liječenje zaraze vrstom *B. ovis* (Cvetnić, 2015.).

2.11. Profilaksa i suzbijanje bolesti

Radi sprječavanja širenja zaraze u stadima ovaca nužna je edukacija stočara s ciljem uspješnosti provođenja općih preventivnih mjera. Potrebno je spriječiti nekontroliran prirodni pripust sa sumnjivim ovnovima, nabava ovnova i uvođenje u rasplod bez kontrole, miješanje stada s drugim stadima ovaca na zajedničkim pašnjacima, provesti karantenu prilikom uvođenja novih grla u stado. Razmjenu ovnova, dopustiti samo uz obaveznu pretragu, radi isključivanja infekcije vrstom *B. ovis*. Janjenje je potrebno provoditi u prostorima koji se mogu očistiti i dezinficirati. Pobačene plodove, plodove ovojnice i stelju na kojoj su životinje boravile nakon janjenja ili pobačaja treba neškodljivo ukloniti, a prostor mehanički očistiti i dezinficirati.

Pravilnikom o mjerama za suzbijanje infekcije *B. ovis* određeni su postupci za suzbijanje infekcije vrstom *B. ovis* (Narodne Novine br. 173/2003.).

Sumnja na infekciju vrstom B. ovis. U slučaju sumnje na infekciju *Brucellom ovis* nadležni veterinarski inspektor mora narediti:

- popisivanje svih prijemljivih životinja na gospodarstvu;
- uzimanje i slanje uzoraka u svrhu laboratorijskog pretraživanja svih ovnova, kako bi se potvrdila ili isključila prisutnost bolesti;
- odvojeno držanje ovnova na gospodarstvu;
- zabranu prometa prijemljivim životinjama s gospodarstva i zabranu uvođenja na gospodarstvo prijemljivih životinja.

Ako je infekcija *B. ovis* potvrđena u bilo koje životinje u stadu cijelo se stado smatra zaraženim. Nakon službene potvrde o pojavi infekcije sa *B. ovis* u stadu nadležni veterinarski inspektor naređuje sljedeće mjere:

- označivanje i popis svih prijemljivih životinja u stadu u kojem je službeno potvrđena infekcija vrstom *B. ovis*;
- upućivanje na klanje ili kastraciju svih ovnova u kojih je potvrđena infekcija vrstom *B. ovis*, s tim da kastrirani ovnovi, nakon oporavka, mogu biti vraćeni u stado;
- zabranu stavljanja u promet, osim upućivanja na klanje, svih ostalih prijemljivih životinja iz stada u kojem je potvrđena infekcija vrstom *B. ovis*;
- zabranu uvođenja prijemljivih životinja na zaraženo gospodarstvo;
- dezinfekciju objekta i prostora u kojem su boravile zaražene životinje te predmeta s kojima je zaraženo stado bilo u dodiru, prije njihove ponovne uporabe;
- ovnovi iz zaraženog stada koji s negativnim nalazom, pretraživanjem na infekciju vrstom *B. ovis* moraju još jednom biti pretraženi u razdoblju od 30 do 60 dana nakon prvog pretraživanja;
- odvojeno držanje ovnova koji su prvim testiranjem polučili negativne rezultate;
- epidemiološko istraživanje u okviru kojega moraju biti prikupljeni najmanje sljedeći podaci:
 - broj životinja u stadu,
 - kretanje životinja s/na gospodarstvo u posljednjih 6 mjeseci,
 - kada su primijećeni prvi znakovi bolesti,
 - mogući izvori zaraze na zaraženom gospodarstvu,
 - popis drugih gospodarstava na kojima se drže životinje koje su mogle biti zaražene iz istoga/istih izvora,
- dvokratno pretraživanje u razmaku od 30 do 60 dana, svih ovnova na gospodarstvu/ gospodarstvima koja su epidemiološki povezana sa zaraženim gospodarstvom.

2.11.1. Stavljanje u promet životinja iz zaraženog stada:

- Nekastrirani ovnovi koji potječu iz stada s gospodarstva koje je bilo zaraženo mogu biti stavljeni u promet za rasplod nakon isteka 12 mjeseci od provedbe svih naređenih mjera, s tim da 30 dana prije stavljanja u promet moraju biti serološki pretraženi na *B. ovis*, a rezultat pretrage mora biti negativan;
- Druge prijemljive životinje za rasplod koje potječu iz stada s gospodarstva koje je bilo zaraženo, osim ovnova, mogu biti stavljene u promet za rasplod nakon dvokratnog serološkog pretraživanja u razmaku od 30 do 60 dana, s negativnim rezultatom, s time da drugo pretraživanje mora biti provedeno najranije 15 dana prije stavljanja u promet;

Uvjeti uvođenje životinja za rasplod u stado:

Ovnovi za rasplod mogu biti uvedeni u stado ako:

- dolaze s gospodarstva na kojem infekcija *B. ovis* nije dijagnosticirana u posljednjih 12 mjeseci;
- su kontinuirano držani na istom gospodarstvu 60 dana prije utovara;
- su najranije 30 dana prije utovara bili serološki pretraženi, i da je rezultat pretraga bio negativan.

Radi sprječavanja širenja infekcije *B. ovis* preporučuje se provedba umjetnoga osjemenjivanja ovaca, a prirodni je pripust dopušten samo rasplodnim ovnovima slobodnim od infekcije vrstom *B. ovis*. Ako je infekcija s *B. ovis* potvrđena u ovnova koji borave ili su se vratili sa sezonske ispaše, a epidemiološkim istraživanjem utvrdi se da su na pašnjacima boravili zajedno s ovcama iz drugih stada, tada sve ovnove iz stada koja su se miješala na pašnjacima treba smatrati zaraženima i svi moraju biti pretraženi službenim testom. Zabranjeno je liječenje životinja oboljelih od infekcije vrstom *B. ovis*.

2.12. Testiranje i klanje

Izlučivanje ovnova u kojih se pregledom otkrije povećanje testisa, najlakši je način suzbijanja zaraze vrstom *B. ovis*. Tim načinom može se smanjiti proširenost bolesti u stadu, jer se u nekih inficiranih životinja ne može palpacijom ustvrditi infekcija. Najbolji rezultati u suzbijanju bolesti postižu se kombinacijom kliničkog pregleda i seroloških testova. Palpacijom testisa i imunoenzimnim testom, kao i kasnijim izlučivanjem pozitivnih životinja zaraza iz stada može iskorijeniti za dvije godine.

2.13. Cijepljenje

Cijepljenje je gospodarski najprihvatljiviji i najpraktičniji način za srednjoročnu kontrolu u području s visokom stopom pojave infekcije vrstom *B. ovis*. Do sada su se za cijepljenje koristila razna cjepiva. Bakterije inaktivirane formalinom (bakterini) i vezane na adjuvans pružaju vrlo slabu zaštitu. Osim relativno slabe učinkovitosti bakterina, manjkavosti cijepljenja tim cjepivima odnose se na visoke troškove godišnjeg nadocjepljivanja te dugotrajan serološki odgovor koji ometa tumačenje seroloških pretraga. Do sada se najučinkovitijom cjepivom za epididimitis ovnova pokazalo živo cjepivo Rev 1. Pokusima na ovnovima starim tri do pet mjeseci, supkutanim cijepljenjem jednom dozom od 10^9 CFU postignuta je zaštita od 74 do 100% ovnova (Cvetnić, 2015.).

2.14. Javno zdravstvo

Serološkim testovima dokazana su protutijela za *B. ovis* u ljudi. U Kazahstanu su reakcijom vezanja komplementa (RVK) u 8,3% pastira utvrđena protutijela za *B. ovis*, ali bez zabilježenih slučajeva bolesti u ljudi. Do sada nije poznat ni jedan slučaj izdvajanja *B. ovis* iz čovjeka (Blasco i Marin, 1990.).

3. Materijal i metode

3.1. Serološke pretrage

Uzorci seruma. Tijekom istraživanja u razdoblju od 5 godina (od 2011. do 2015. godini) serološki su u Republici Hrvatskoj na *B. ovīs* infekciju pretraživani uzorci krvnih seruma 18 324 ovnova podrijetlom iz dvadeset županija i Grada Zagreba i 521 krvi ovaca iz stada u kojima su se javljali pobačaji. Godine 2011., pretraženo je 6 028 uzoraka krvi ovnova i 87 krvi ovaca, godine 2012., 1 477 uzoraka krvi ovnova i 67 krvi ovaca, 2013., 2 312 krvi ovnova i 87 krvi ovaca, 2014., 3 871 krvi ovnova i 153 krvi ovaca i godine 2015., pretraženo je 4636 uzoraka krvi ovnova i 127 krvi ovaca (tablica 1.).

Svakom ovnu i ovci iz *vene jugularis* vađeno je 5 do 10 ml krvi, koja je centrifugirana u laboratoriju na 1500 ok/min, a nakon toga uzorci seruma spremljeni na -20°C do izvršenja pretrage.

Tablica 1. Prikaz broja serološki pretraženih ovnova u razdoblju od 2011. do 2015. godine u Republici Hrvatskoj.

Godina	2011	2012	2013	2014	2015	Ukupno
ŽUPANIJA	Broj pretretraženih krvi ovnova i ovaca					
Bjelovarsko-bilogorska	809	197	662	186	103	1 957
Brodsko-posavska	109	7	47	11	15	189
Dubrovačko-neretvanska	0	0	28	3	5	36
Istarska	345	19	19	6	2	391
Karlovačka	426	79	317	783	914	2 519
Koprivničko-križevačka	325	28	6	69	32	460
Krapinsko-zagorska	25	5	4	215	277	526
Ličko-senjska	454	46	143	41	34	718
Međimurska	15	1	0	0	1	17
Osječko-baranjska	412	510	116	36	20	1 094
Požeško-slavonska	614	141	9	55	50	869
Primorsko-goranska	217	18	15	9	11	270
Sisačko-moslavačka	369	198	136	1 422	1 763	3 888
Splitsko-dalmatinska	329	32	3	37	65	466
Šibensko-kninska	709	82	267	142	92	1 292
Varaždinska	24	2	5	94	156	281
Virovitičko-podravska	420	31	395	61	85	992
Vukovarsko-srijemska	80	5	3	2	17	107
Zadarska	163	37	41	89	121	451
Zagrebačka	183	30	87	522	759	1 581
Grad Zagreb	0	9	9	88	114	220
UKUPNO	6 028	1 477	2 312	3 871	4 636	18 324

Serološki testovi. Reakcija vezanja komplementa (RVK) je standardna serološka metoda koja se najčešće koristi kao potvrdna metoda u dijagnostici bruceloze malih preživača i za dokaz *B. ovis*. U RVK, reakcija antigen-protutijelo detektira se vezanjem komplementa, koje se vizualizira pomoću indikatorske reakcije (hemolitičkog sustava). Hemolitički sustav sastoji se od ovčjih eritrocita i protutijela na ovčje eritrocite (amboceptor). Ukoliko su u serumu prisutna protutijela na brucelozu nastaje kompleks antigen-protutijelo na koji se veže komplement te ne dolazi do lize eritrocita. Ako u serumu nema protutijela, uz pomoć komplementa dolazi do aktivacije hemolitičkog sustava tj. do lize eritrocita.

Prije svakog izvođenja RVK pripremaju se svježe otopine eritrocita, komplementa, antigena i amboceptora. Ovčji eritrociti se razrjeđuju dodatkom fiziološke otopine tako da se dobije 2%-tna otopina. Komplement, antigen i amboceptor se razrjeđuju fiziološkom otopinom prema uputama proizvođača.

Reakcija vezanja komplementa izvodila se na mikrotitracijskim pločama (mikrometoda), a izvođi se prema OIE preporukama. Pozitivnim rezultatom se smatrali smo nalaz protutijela od 50 ICFTU/ml seruma ili veći (OIE, 2014.). U pretrazi smo upotrebljavali R- LPS antigen *B. ovis* (VLA Waybridge, UK), amboceptor (hemolizin) i 2% eritrocita ovna.

Izvođenje testa. Serumi se rutinski pretražuju u razrjeđenju 1 : 2,5 i 1 : 5, a u slučaju pozitivne reakcije pretraga se nastavlja do konačnog razrjeđenja, te se prilikom svake pretrage koristi pozitivna (K+) i negativna (K-) kontrola.

Na 100 µl seruma doda se 150 µl fiziološke otopine (dobije se razrjeđenje 1 : 2,5), pa se tako razrijeđeni serum inaktivira u vodenoj kupelji 30 minuta na 56 °C za goveda i svinje, odnosno 60 °C za ovce, koze i konje (pri zagrijavanju seruma se inaktivira komplement normalno prisutan u serumu).

U prvi red mikrotitarske pločice u 1. i 2. jažicu stavlja se 25 µl K+ , a u drugi red pločice u 1. i 2. jažicu se stavi 25 µl K-. U treći red i ostale redove pločice se u 1., 2. i 3. jažicu stavi po 25 µl seruma koji se testiraju (prethodno razrijeđeni i inaktivirani)

U 3. jažicu uz serum se dodaje još 25 µl fiziološke otopine, sadržaj jažice se promiješa te se 25 µl uklanja – tako se u 3. jažici dobije razrjeđenje seruma 1 : 5. U svaku 1. jažicu dodaje se 25 µl fiziološke otopine, a u ostale jažice po 25 µl antigena. U sve jažice se dodaje po 25 µl komplementa.

Pločica s dodanim antigenom i komplementom se zatim inkubira u vodenoj kupelji

20 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije u sve jažice dodaje se 50 µl hemolitičke otopine (sastoji se od 2%-tne otopine ovčjih eritrocita i amboceptora pomiješanih u omjeru 1 : 1), a zatim se pločica inkubira 20 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije vrši se prosuđivanje reakcija:

- Prva jažica koja ne sadrži antigen služi za kontrolu antikomplementarnosti pretraživanog seruma i u njoj bi uvijek trebala biti prisutna potpuna hemoliza.
- U drugoj i trećoj jažici prosuđuje se izostanak hemolize eritrocita uslijed reakcije antigen – protutijelo iz seruma
- S obzirom na stupanj hemolize razlikuje se 0 (oznaka 4+), 25 (oznaka 3+), 50 (oznaka 2+), 75 (oznaka 1+) i 100% hemoliza (oznaka -).
- Prilikom utvrđene pozitivne reakcije u razrjeđenju seruma 1 : 2,5 i 1 : 5 pretraga se nastavlja do konačnog razrjeđenja seruma.

3.2. Patomorfološke pretrage

Uzorci materijala. Od serološki pozitivnih ovnova uz pristanak vlasnika uzorkovan je biološki materijal za patomorfološke i bakteriološke pretrage. Testesi i epididimisi uzorkovani su nakon kastracije 15 ovnova. Nakon klanja 11 ovnova uzorkovani su testis i epididimisi i limfni čvorovi (*Inn. inguinalis*, *Inn. ilici mediales* i *Inn. lumbales aortici*) iz Zagrebačke županije, Primorsko-goranske, Bjelovarsko-bilogorske i Sisačko-moslavačke. Isto tako u istraživanom razdoblju bakteriološki su na *B. ovis* infekciju pretraženi organi i sadržaj želuca 8 pobačenih plodova i 6 posteljica prilikom pobačaja ovaca.

3.3. Bakteriološke pretrage

Bakteriološka obrada. Bakteriološki su pretraženi uzorci tkiva epididimisa, testisa i limfnih čvorova 26 ovna, 8 plodova i 6 posteljice nakon pobačaja ovaca. Nekoliko grama materijala (testisa, limfnih čvorova, posteljice i organa plodova te 1 ml sadržaja želuca pobačenih plodova) smo obradili i oko 1 ml homogenata nacijepili na selektivne hranjive podloge i to na krvni agar, Brucella agar i modificiranu poluselektivnu hranjivu podlogu po Thayer-Martinu (Alton i sur. 1988., Marin i sur. 1996.). Ploče s nacijepljenim materijalom inkubirali smo na 37 °C uz prisustvo 10% CO₂, a rast kolonija je promatran u dnevnim razmacima.

Razmasci pretraživanog materijala mogu se obojati po Gramu ili Stampu i dokazati karakteristični gram-negativni kokobacili. U takvim uzorcima mogu biti prisutne i druge bakterije slične morfologije ili karakteristika bojanja (*B. melitensis*). Za specifičnu identifikaciju *B. ovis* iz razmasku sjemeni može se primijeniti metoda izravne ili neizravne imunofluorescencije.

Oko 1 ml sumnjivog homogenata naciepljuje se na selektivne hranjive podloge i to najčešće na modificiranu selektivnu podlogu Thayer-Martin, a može se naciepiti na krvni agar i *Brucella* agar. Podloge s naciepljenim materijalom inkubiraju se pri temperaturi od 37 °C uz dodatak 5–10% CO₂. Rast kolonija promatra se u dnevnim razmacima, a obično je vidljiv za tri do sedam dana. Izolati se identificiraju na temelju morfologije kolonija, biokemijskih svojstava i molekularnih postupaka (OIE, 2014.).

3.4. Identifikacija izolata

Morfološke karakteristike. Izolate smo identificirali na bazi morfologije kolonija, rasta uz prisutnost 5–10% CO₂ atmosferi, produkciji H₂S, rasta na podlogama s dodatkom 20 µg/ml tionina i bazičnog fuksina i aglutinaciji antiseruma R (Alton i sur. 1988., Corbel i sur. 1983.).

Pretrage metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Nakon izdvajanja *B. ovis* bakteriološkom pretragom iz materijala metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) pretraženo je 20 izolata *B. ovis* podrijetlom od 26 ovnova.

Izolacija DNA. Bakterijske kulture su razmućene u 100 µl destilirane vode (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen, Velika Britanija), kuhane 20 minuta na 95 °C te centrifugirane na 14 000 g 1 minutu. Supernatant je korišten kao DNA kalup u PCR reakciji. Za kontrolu koristili smo standardne sojeve brucela: *B. abortus* 544, *B. melitensis* 16M, *B. ovis* 63/290 i *B. suis* 1330.

3.4.1. Dokaz pripadnosti izolata rodu *Brucella* sp. i vrsti *Brucella ovis*

Za dokaz pripadnosti izolata rodu *Brucella* sp. koristili smo lančanu reakciju polimerazom, koja se bazira na umnažanju djela genoma koji kodira sintezu proteina BCSP – 31 karakterističnog za rod *Brucella*. Očekivana veličina produkta umnažanja iznosi približno 440 bp (Serpe i sur. 1999.).

Za identifikaciju vrste brucela korišten je multiplex PCR (Bruce-ladder) (Garcia-Yoldi i sur. 2006.).

Reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 μ l se sastojala od 10 μ l QIAGEN Multiplex PCR Master Mix-a (Qiagen, Njemačka), 5 μ l vode (RNase-Free Water, Qiagen, Njemačka), 0,4 μ M početnica BMEI0998f i BMEI0 997r (Invitrogen, Velika Britanija), 0,1 μ M svake od ostalih početnica opisanih u referenci te 2 μ l DNA. Umnažanje PCR produkata rađeno je na toplokružniku Veriti (Applied Biosystems, SAD), s početnom denaturacijom na 95 °C 15 minuta te 35 ciklusa denaturacije (95 °C/30 sec), vezanja početnica (64 °C/45 sec) i produljivanja lanaca (72 °C/3 min), sa završnim korakom produljivanja lanaca (72 °C /10 min).

Očekivane veličine PCR produkata za *B. ovis* su 1072, 794, 587, 450 i 152 parova baza (pb), za *B. abortus* 1682, 794, 587, 450 i 152 pb, za *B. melitensis* 1682, 1072, 794, 587, 450 i 152 pb i za *B. suis* 1682, 1072, 794, 587, 450, 272 i 152 pb. Produkti umnožavanja DNA analizirani su pomoću uređaja za kapilarnu elektroforezu QIAxcel (Qiagen, SAD).

4. Rezultati

4.1. Rezultati seroloških pretraga

Tijekom istraživanog razdoblja od 2011. do 2015. godine pretraženo je 18 324 seruma rasplodnih ovnova, a pozitivne reakcije utvrđene su u 1 100 (6%). Od 521 krvi pretražene ovce pozitivne reakcije utvrđene su u 12 (2,3%) krvnih uzoraka ovaca.

Tijekom 2011. godine serološki je pretraženo 6 028 krvi ovnova iz 19 županija. Pozitivne reakcije utvrđene su u 246 (4,1%) ovnova iz 14 županija. Najviše pozitivnih ovnova utvrđeno je u Splitsko-dalmatinskoj županiji (26,7%), zatim u Šibensko-kninskoj (5,9%), u Ličko-senjskoj (4,2%), Primorsko-goranskoj (3,7%) u drugim županijama su pozitivne reakcije utvrđene u malom broju ovnova. Na području grada Zagreba i u Dubrovačko-neretvanskoj županiji nisu vršene pretrage, a u Međimursko, Brodsko-

Tablica 2. Broj pretraženih krvi ovnova na *B. ovis* tijekom 2011. na području Republike Hrvatske.

Broj pretraženih krvi na <i>B. ovis</i> u 2011. godini			
ŽUPANIJA	Broj pretraženih krvi ovnova	Broj pozitivnih ovnova	% pozitivnih ovnova
Bjelovarsko-bilogorska	809	29	3,6
Brodsko-posavska	109	0	0
Dubrovačko-neretvanska	0	0	0
Istarska	345	2	0,6
Karlovačka	426	8	1,9
Koprivničko-križevačka	325	1	0,3
Krapinsko-zagorska	25	0	0
Ličko-senjska	454	19	4,2
Međimurska	15	0	0
Osječko-baranjska	412	5	1,2
Požeško-slavonska	614	17	2,8
Primorsko-goranska	217	8	3,7
Sisačko-moslavačka	369	3	0,8
Splitsko-dalmatinska	329	88	26,7
Šibensko-kninska	709	42	5,9
Varaždinska	24	0	0
Virovitičko-podravska	420	21	5
Vukovarsko-srijemska	80	2	2,5
Zadarska	163	11	6,7
Zagrebačka	183	0	0
Grad Zagreb	0	0	0
UKUPNO	6 028	246	4,1

posavskoj, Krapinsko-zagorskoj, Varaždinskoj i u Zagrebačkoj županiji nisu utvrđene pozitivne reakcije, ali broj pretraženih ovnova je bio malen (tablica 2.).

Godine 2012. pretraženo je 1 477 krvi ovnova u 20 županija, a pozitivne reakcije utvrđene su u 64 (4,3%) ovna iz osam županija. Najviše pozitivnih reakcija utvrđeno je u Splitsko-dalmatinskoj (28,1%), u Šibensko-kninskoj (19,5%), zatim u Brodsko-posavskoj (14,3%), Zadarskoj (13,5%), Bjelovarsko-bilogorskoj (8,6%) u drugim županijama su pozitivne reakcije utvrđene u malom broju ovnova. U Dubrovačko-neretvanskoj županiji nisu vršene pretrage, a Istarskoj, Karlovačkoj, Koprivničko-križevačkoj, Krapinsko-zagorskoj, Međimurskoj, Požeško-slavonskoj, Primorsko-goranskoj, Varaždinskoj, Virovitičko-podravskoj, Vukovarsko-srijemskoj, Zagrebačkoj i na području grada Zagreba nisu utvrđene pozitivne serološke reakcije (tablica 3.).

Tablica 3. Broj pretraženih krvi ovnova na B. ovis tijekom 2012. na području Republike Hrvatske.			
Broj pretraženih krvi ovnova u 2012. godini			
ŽUPANIJA	Broj pretraženih krvi ovnova	Broj pozitivnih ovnova	% pozitivnih ovnova
Bjelovarsko-bilogorska	197	17	8,6
Brodsko-posavska	7	1	14,3
Dubrovačko-neretvanska	0	0	0
Istarska	19	0	0
Karlovačka	79	0	0
Koprivničko-križevačka	28	0	0
Krapinsko-zagorska	5	0	0
Ličko - senjska	46	1	2,2
Međimurska	1	0	0
Osječko-baranjska	510	15	2,9
Požeško-slavonska	141	0	0
Primorsko-goranska	18	0	0
Sisačko-moslavačka	198	7	3,5
Splitsko-dalmatinska	32	9	28,1
Šibensko-kninska	82	16	19,5
Varaždinska	2	0	0
Virovitičko-podravska	31	0	0
Vukovarsko-srijemska	5	0	0
Zadarska	37	5	13,5
Zagrebačka	30	0	0
Grad Zagreb	9	0	0
UKUPNO	1 477	64	4,3

Godine 2013. pretraženo je 2 312 krvi ovnova u 20 županija, pozitivne reakcije utvrđene su u 121 krvi (5,2%) iz osam županija. Najviše pozitivnih reakcija utvrđeno je u Dubrovačko-neretvanskoj županiji (42,9%), zatim u Splitsko-dalmatinskoj (33,3%), u Šibensko-kninskoj (17,2%), Ličko-senjskoj (13,3%), Zadarskoj (7,3%), Virovitičko-podravskoj (6,1%) u drugim županijama utvrđen je manji postotak pozitivnih ovnova. U Međimurskoj županiji nisu vršene pretrage, a u Istarskoj, Karlovačkoj, Koprivničko-križevačkoj, Krapinsko-zagorskoj, Požeško-slavonskoj, Primorsko-goranskoj, Sisačko-moslavačkoj, Varaždinskoj, Vukovarsko-srijemskoj, Zagrebačkoj i na području grada Zagreba nisu utvrđene pozitivne serološke reakcije (tablica 4.).

Tablica 4. Broj pretraženih krvi ovnova na B. ovis tijekom 2013. na području Republike Hrvatske.			
Broj pretraženih krvi ovnova u 2013. godini			
ŽUPANIJA	Broj pretraženih krvi ovnova	Broj pozitivnih ovnova	% pozitivnih ovnova
Bjelovarsko-bilogorska	662	14	2,1
Brodsko-posavska	47	0	0
Dubrovačko-neretvanska	28	12	42,9
Istarska	19	0	0
Karlovačka	317	0	0
Koprivničko-križevačka	6	0	0
Krapinsko-zagorska	4	0	0
Ličko-senjska	143	19	13,3
Međimurska	0	0	0
Osječko-baranjska	116	3	2,6
Požeško-slavonska	9	0	0
Primorsko-goranska	15	0	0
Sisačko-moslavačka	136	0	0
Splitsko-dalmatinska	3	1	33,3
Šibensko-kninska	267	46	17,2
Varaždinska	5	0	0
Virovitičko-podavska	395	24	6,1
Vukovarsko-srijemska	3	0	0
Zadarska	41	3	7,3
Zagrebačka	87	0	0
Grad Zagreb	9	0	0
UKUPNO	2 312	121	5,2

U 2014. godini pretražena je 3 871 krv ovna u 20 županija, pozitivne reakcije utvrđene su u 326 (8,4%) krvi u 17 županija. Najviše pozitivnih reakcija utvrđeno je u Dubrovačko-neretvanskoj županiji (100%), ali je pretražen malen broj ovnova samo tri iz jednog uzgoja, zatim u Virovitičko-podravskoj (57,4%), u Splitsko-dalmatinskoj (56,8%), u Zadarskoj (51,7%), Šibensko-kninskoj (49,3%), Ličko-senskoj (41,5%), Osječko-baranjskoj (38,9%), Koprivničko-križevačkoj (26,1%), Bjelovarsko-bilogorskoj (15,1%) u ostalim županijama pretražen je manji broj ovnova i utvrđen je niži postotak pozitivnih reakcija. U Međimurskoj županiji nisu vršene pretrage a u Istarskoj, Karlovačkoj, Koprivničko-križevačkoj, Krapinsko-zagorskoj, Požeško-slavonskoj, Primorsko-goranskoj, Sisačko-moslavačkoj, Varaždinskoj, Vukovarsko-srijemskoj županiji i na području grada Zagreba nisu utvrđene pozitivne serološke reakcije (tablica 5.).

Tablica 5. Broj pretraženih krvi ovnova na B. ovis tijekom 2014. na području Republike Hrvatske.			
Broj pretraženih krvi ovnova u 2014. godini			
ŽUPANIJA	Broj pretraženih krvi ovnova	Broj pozitivnih ovnova	% pozitivnih ovnova
Bjelovarsko-bilogorska	186	28	15,1
Brodsko-posavska	11	1	9,1
Dubrovačko-neretvanska	3	3	100
Istarska	6	1	16,7
Karlovačka	783	2	0,3
Koprivničko-križevačka	69	18	26,1
Krapinsko-zagorska	215	1	0,5
Ličko-senjska	41	17	41,5
Međimurska	0	0	0
Osječko-baranjska	36	14	38,9
Požeško-slavonska	55	33	60
Primorsko-goranska	9	1	11,1
Sisačko-moslavačka	1 422	16	1,1
Splitsko-dalmatinska	37	21	56,8
Šibensko-kninska	142	70	49,3
Varaždinska	94	0	0
Virovitičko-podravska	61	35	57,4
Vukovarsko-srijemska	2	0	0
Zadarska	89	46	51,7
Zagrebačka	522	20	3,8
Grad Zagreb	88	0	0
UKUPNO	3 871	326	8,4

Godine 2015. pretraženo je 4 636 krvi ovnova u 20 županija i na području grada Zagreba, pozitivne reakcije utvrđene su u 324 (7%) krvi ovnova iz 12 županija. Najviše pozitivnih reakcija utvrđeno je u Koprivničko-križevačkoj županiji (71,9%), zatim u Zadarskoj (59,5%), u Splitsko-dalmatinskoj (55,4%), u Šibensko-kninskoj (53,3%), u Virovitičko-podravskoj (52,9%), u Bjelovarsko-bilogorskoj (44,7%), u Požeško-slavonskoj (26%), Vukovarsko-srijemskoj u 17,6%), u drugim županijama utvrđen je manji postotak pozitivnih ovnova. U Brodsko-posavskoj, Dubrovačko-neretvanskoj, Istarskoj, Krapinsko-zagorskoj, Ličko-senskoj, Međimurskoj i Primorsko-goranskoj nisu utvrđene pozitivne serološke reakcije (tablica 6.).

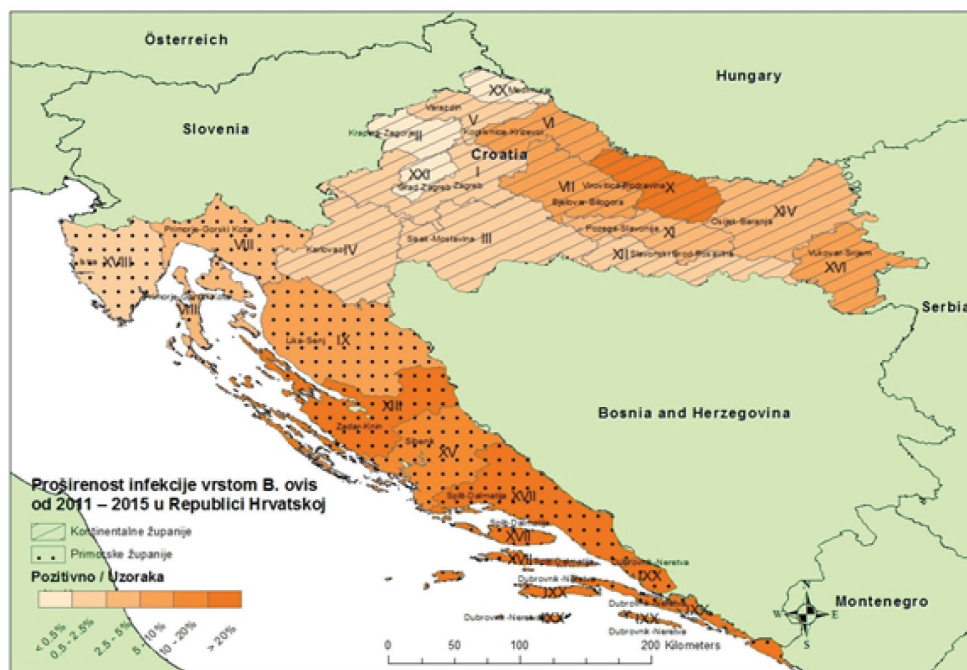
Tijekom istraživanog razdoblja od 2011. do 2015. godine pretraženo je 18 324 seruma rasplodnih ovnova, a pozitivne reakcije utvrđene su u 1 100 (6%). Od 521 krvi pretražene

Tablica 6. Broj pretraženih krvi ovnova na B. ovis tijekom 2015. na području Republike Hrvatske.			
Broj pretraženih krvi ovnova u 2015. godini			
ŽUPANIJA	Broj pretraženih krvi ovnova	Broj pozitivnih ovnova	% pozitivnih ovnova
Bjelovarsko-bilogorska	103	46	4,47
Brodsko-posavska	15	0	0
Dubrovačko-neretvanska	5	0	0
Istarska	2	0	0
Karlovačka	914	11	1,2
Koprivničko-križevačka	32	23	71,9
Krapinsko-zagorska	277	0	0
Ličko-senjska	34	0	0
Međimurska	1	0	0
Osječko-baranjska	20	2	10,0
Požeško-slavonska	50	13	26,0
Primorsko-goranska	11	0	0
Sisačko-moslavačka	1 763	6	0,3
Splitsko-dalmatinska	65	35	55,4
Šibensko-kninska	92	49	53,3
Varaždinska	156	2	1,3
Virovitičko-podravska	85	45	52,9
Vukovarsko-srijemska	17	3	17,6
Zadarska	121	72	59,5
Zagrebačka	759	16	2,1
Grad Zagreb	114	1	0,9
UKUPNO	4 636	324	7,0

ovce pozitivne reakcije utvrđene su u 12 (2,3%) krvnih uzoraka ovaca u stadima u kojima su se pojavljivali pobačaji. Tijekom istraživnog razdoblja najviše pozitivnih reakcija utvrđeno je u Dubrovačko-neretvanskoj županiji (41,7%) iako je pretražen relativno malen broj ovnova, zatim u Splitsko-dalmatinskoj (33%), Zadarskoj (30,4%), Šibensko-kninskoj (17,3%), Virovitičko-podravskoj (12,6%), Koprivničko-križevačkoj (9,1%), Ličko-senjskoj (7,8%) i Bjelovarsko-bilogorskoj (6,8%), u ostalim županijama utvrđen je manji postotak pozitivnih reakcija. Pozitivne reakcije nisu utvrđene u ovnova u Međimurskoj županiji, a u toj županiji pretraženo je samo 17 ovnova (tablica 7., kartogram 1).

Tablica 7. Broj pretraženih krvi ovnova na *B. ovis* tijekom istraživnog razdoblja od 2011. do 2015. na području Republike Hrvatske.

Broj pretraženih krvi ovnova u razdoblju od 2011. do 2015. godine			
ŽUPANIJA	Broj pretraženih krvi ovnova	Broj pozitivnih ovnova	% pozitivnih ovnova
Bjelovarsko-bilogorska	1 957	134	6,8
Brodsko-posavska	189	2	1,1
Dubrovačko-neretvanska	36	15	41,7
Istarska	391	3	0,8
Karlovačka	2 519	21	0,8
Koprivničko-križevačka	460	42	9,1
Krapinsko-zagorska	526	1	0,2
Ličko-senjska	718	56	7,8
Međimurska	17	0	0
Osječko-baranjska	1 094	39	3,6
Požeško-slavonska	869	63	0,5
Primorsko-goranska	270	9	3,3
Sisačko-moslavačka	3 888	32	0,8
Splitsko-dalmatinska	466	154	33,0
Šibensko-kninska	1 292	233	17,3
Varaždinska	281	2	0,7
Virovitičko-podravsko	992	125	12,6
Vukovarsko-srijemska	107	5	4,7
Zadarska	451	137	30,4
Zagrebačka	1 581	36	2,3
Grad Zagreb	220	1	0,5
UKUPNO	18 324	1 100	6,0

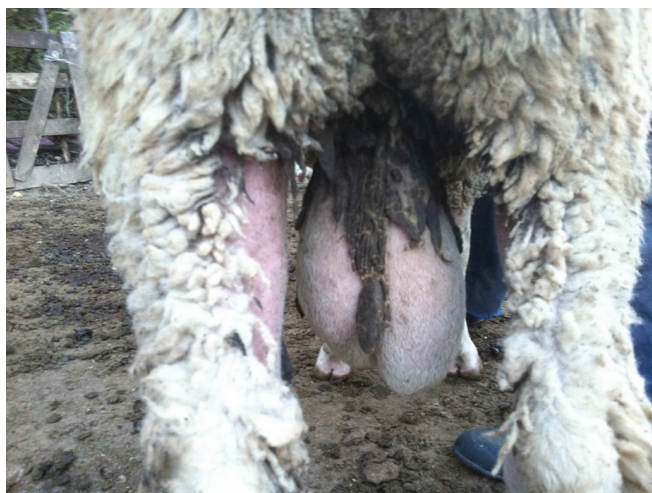


Kartogram 1. Na slici je prikazana rasprostranjenost *B. ovis* u pojedinim županijama u razdoblju od 2011. 2015. godine.

4.2. Rezultati kliničkog pregleda

Nakon epizootiološke ankete u nekim seropozitivnim stadima ovaca izvršili smo klinički pregled seropozitivnih ovnova. U trenutku pregleda broj seropozitivnih ovnova je smanjen zbog uginuća ili izlučivanja iz stada. Većina vlasnika je ovnove s otečenjem testisa uklonila iz stada.

Kliničkim pregledom adspekcijom i palpacijom epididimisa i testisa 12 ovnova iz 7 seropozitivnih stada, u 5 (41,7%) serološki pozitivnih ovnova utvrđena je asimetrija skrotuma (slika 1) i jednostrano uvećanje repa epididimisa. Promjene u veličini epididimisa kretale su se do veličine kokošnjeg jajeta. Osjetljivost i bolnost epididimisa utvrđena je kod četiri od pet ovnova sa promjenama (80%) i očitovala se je otporom i trzanjem ovnova u toku pregleda palpacijom. Temperiranost regije nije ustanovljena. Testisi su bili pokretljivi u skrotalnoj vreći.



Slika 1. Asimetrija skrotuma u ovnova inficiranih vrstom *Brucella ovis*.

4.3. Rezultati patomorfoloških pretraga

Makroskopskim pregledom epididimisa i testisa patološke promjene koje su ukazivale na infekciju s *B. ovis* utvrđene su u testisima 7 (58,3%) od 12 pretraženih ovnova. Utvrđen je različit stupanj oštećenja koja su karakteristična za akutni i kronični tijek bolesti. U prvom slučaju promjene su bile nekrotičnog karaktera, a u kroničnom tijeku uočeni su granulomi, fibroza i atrofija testisa i epididimisa.

Karakteristični makroskopski nalaz bio je jednostrani epididimitis u 7 (58,3%) od 12 pregledanih ovnova (slika 2 i 3). Svih sedam ovnova sa uvećanim epididimisom imalo



Slika 2. Testisi skinutih ovojnica; može se uočiti testis normalne građe (gore) i atrofičan testis i uvećani epididimis, nodularno izmenjeni, teže prepoznatljivih anatomskih struktura, mjestimično prekriveni trakastim priraslicama (dolje).

je naznačenu hipertrofiju repa, 4 (33,3%) su imali hipertrofiju tijela, a 2 (16,7%) glave epididimisa. U repu epididimisa 2 (16,67%) ovna utvrđena je spermatocela. Pregledom limfnih čvorova nisu utvrđene makroskopske promjene.

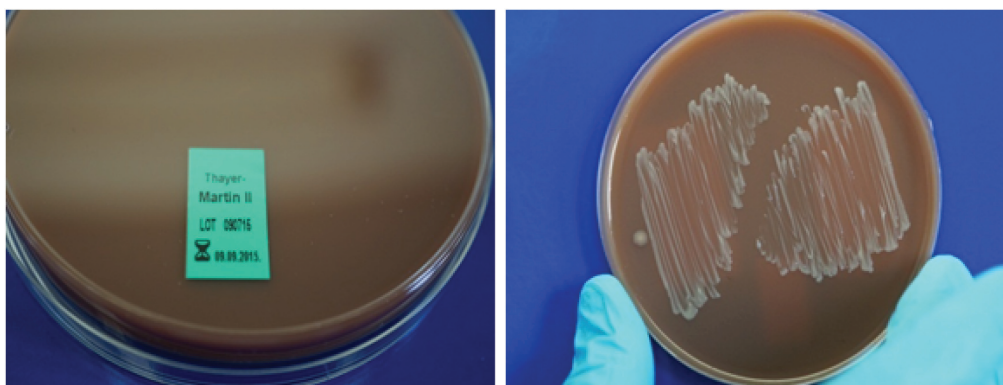


Slika 3. Kronična upala uzrokovana vrstom *Brucella ovis* karakterizira se i granulomatoznim područja u epididimisu.

4.4. Rezultati bakterioloških pretraga

Bakteriološkom pretragom obrađeni su uzorci tkiva epididimisa, testisa i limfnih čvorova porijeklom od 26 ovnova. Izdvojeno je 20 izolata (76,9%) od 26 serološki pretraženih ovnova.

Na selektivnim podlogama kultiviranim u atmosferi sa dodatkom 10% CO₂, na temperaturi od 37 °C, kolonije su bile vidljive od 3. do 4. dana kultivacije. Kolonije svih izolata iz organa ovnova bile su hrapave (»R« faza rasta), okrugle, konveksne sa



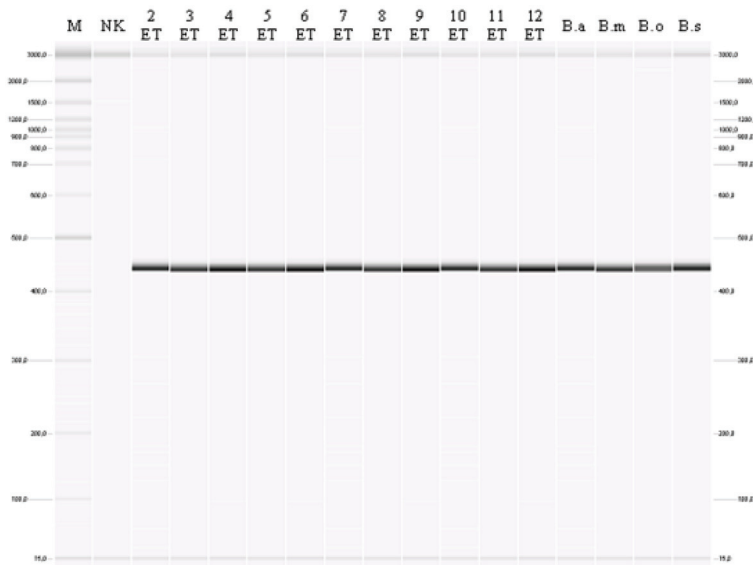
Slika 4. Prikaz izdvojenih kolonija *B. ovis* na Thayer-Martinu hranjivoj podlozi

ravnim ivicama i punog ruba. Mikroskopski razmazi izdvojenih kultura, starih oko 24 sata, obojeni su po Gramu. Bakterije su bile crveno obojene, gram negativne. Testom aglutinacije sa monospecifičnim antiserumima A, M i R, svi izolati dali su vidljivu reakciju aglutinacije sa R monospecifičnim antiserumom. U reakciji aglutinacije sa monospecifičnim antiserumima A i M nije bilo aglutinacije.

4.5. Rezultati molekularnih pretraga

Dokaz pripadnosti rodu *Brucella* spp.

Svih 20 izolata i standardni referentni sojevi *B. abortus* 544, *B. melitensis* 16M, *B. ovis* 63/290 i *B. suis* 1330 identificirani su metodom lančane reakcije polimerazom kao pripadnici roda *Brucella* spp. Identifikacija je izvršena na osnovu očekivane veličine produkta umnožavanja od 440 baznih parova (slika 5. i 6.).



Slika 5. Dokaz pripadnosti rodu *Brucella* spp.

Izolati brucela iz tkiva epididimisa i testisa ovnova.

Legenda:

M – marker sa produktima umnožanja veličina 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000 i 3000 baznih parova

NK – negativna kontrola

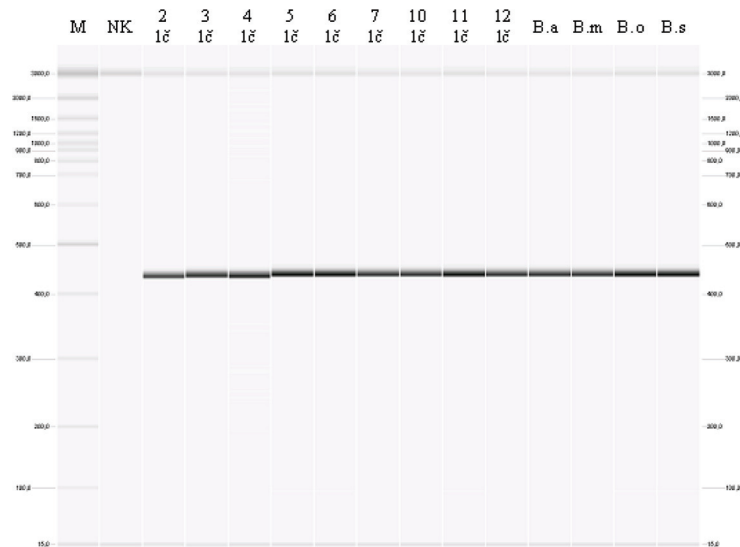
Izolati *Brucella ovis* iz tkiva epididimisa i testisa ovnova oznake ET2 do ET12

B.a – *Brucella abortus* 544

B.m – *Brucella melitensis* 16M

B.o – *Brucella ovis* 63/290

B.s – *Brucella suis* 1330



Slika 6. Dokaz pripadnosti rodu *Brucella* spp.
Izolati brucela iz tkiva limfnih čvorova ovnova

Legenda:

M – marker sa produktima umnožanja veličina 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000 i 3000 baznih parova

NK – negativna kontrola

Izolati *Brucella ovis* iz tkiva limfnih čvorova ovnova Lč2 do Lč7 i Lč10 do Lč12

B.a – *Brucella abortus* 544

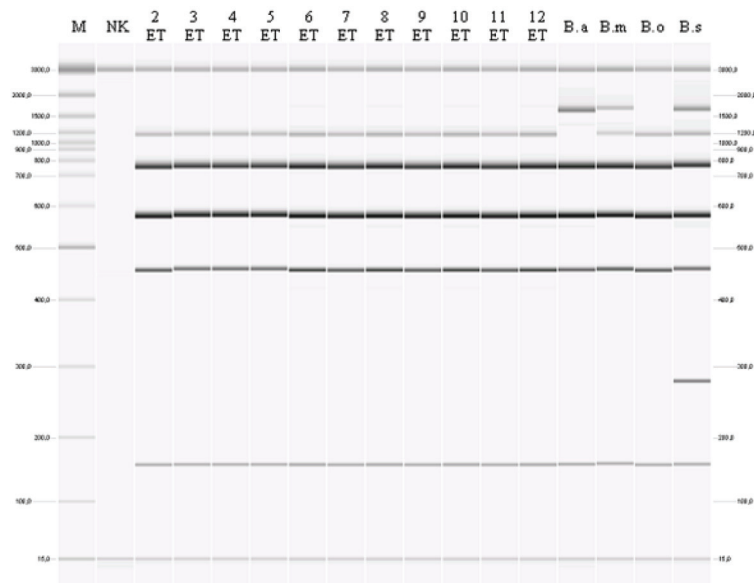
B.m – *Brucella melitensis* 16M

B.o – *Brucella ovis* 63/290

B.s – *Brucella suis* 1330

4.5.1. Dokaz pripadnosti vrsti *Brucella ovis*

Tipizacija izolata brucela izvršena je metodom multiplex PCR-om (*Bruce-ladder*). Svih 20 izolata brucela identificirani su kao pripadnici vrste *Brucella ovis*. PCR profil izolata poklapa se s profilom standardnog referentnog soja *B. ovis* 63/290. Očekivane veličine PCR produkata za *Brucella ovis* su 1071, 794, 587, 450 i 152 baznih parova. (slika 7. i 8.).



Slika 7. Dokaz pripadnosti vrsti *Brucella ovis*. Izolati brucela iz tkiva epididimisa i testisa ovnova, *multiplex* PCR (*Bruce-ladder*).

Legenda:

M – marker sa produktima umnožanja veličina 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000 i 3000 baznih parova

NK – negativna kontrola

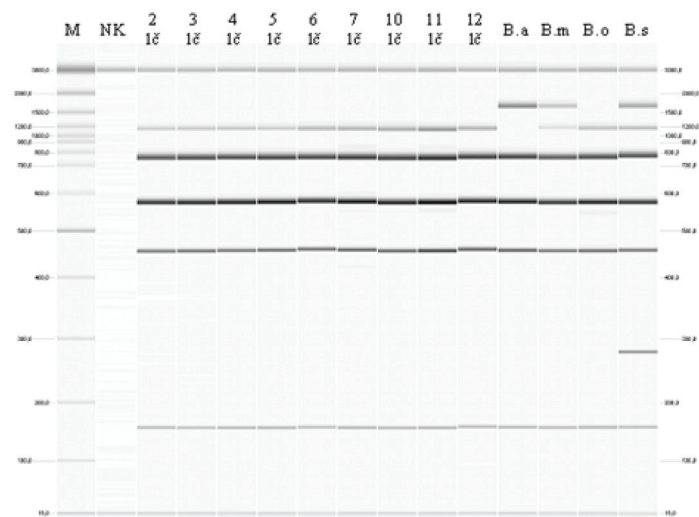
Izolati *Brucella ovis* iz tkiva epididimisa i testisa ovnova od ET2 do ET12

B.a – *Brucella abortus* 544,

B.m – *Brucella melitensis* 16M,

B.o – *Brucella ovis* 63/290,

B.s – *Brucella suis* 1330



Slika 8. Dokaz pripadnosti vrsti *Brucella ovis*. Izolati brucela iz tkiva limfnih čvorova ovnova, *multiplex PCR (Bruce-ladder)*.

Legenda:

M – marker sa produktima umnožanja veličina 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000 i 3000 baznih parova

NK – negativna kontrola

Izolati *Brucella ovis* iz tkiva limfnih čvorova ovnova Lč2 do Lč7 i Lč10 do Lč12

B.a – *Brucella abortus* 544

B.m – *Brucella melitensis* 16M

B.o – *Brucella ovis* 63/290

B.s – *Brucella suis* 1330

5. Rasprava

Brucella ovis je uzročnik ovčjeg epididimitisa, kontagiozne zarazne bolesti ovnova i ovaca. Bolest se očituje kroničnim tijekom i slabo izraženim kliničkim simptomima, što u velikoj mjeri otežava njeno pravovremeno otkrivanje, suzbijanje i iskorjenjivanje. Pojava asimetrije skrotuma, epididimisa i orhitisa u ovnova, pobačaja ovaca, janjenja mrtvorođene i avitalne janjadi, povećanog perinatalnog mortaliteta ili manjeg broja ojanjene janjadi u usporedbi sa prethodnim godinama pobuđuje sumnju i na infekciju izazvanu sa *B. ovis*. Konačnu dijagnozu moguće je postaviti samo laboratorijskom dijagnostikom, a uzročnika je moguće izdvojiti i iz seronegativnih i klinički zdravih ovnova (Petrović i sur. 2014., Picard-Hagen i sur. 2015., Olsen i Palmer, 2016.).

Ovčji epididimitis uzrokovan vrstom *B. ovis* dokazan je u zemljama koje se tradicionalno bave uzgojem ovaca. Kasnijim istraživanjem Špičić i sur. (2009. i 2010.) opisuju nalaz 2% serološki pozitivnih ovaca u 10 županija u Republici Hrvatskoj. Našim istraživanjem u razdoblju od 2011. do 2015. godine pozitivne reakcije utvrđene su u 1100 (6%) od 18 324 pretražene krvi ovnova iz 20 županija u Republici Hrvatskoj i u 12 (2,3%) od 521 krvi ovce. Naše istraživanje pokazuje da bolest nije suzbijena i da se pojavljuje u svim područjima gdje se uzgajaju ovce. Osobito u južnom dijelu Hrvatske. Petrović i sur. (2014.) u jednoj regiji u južnoj Srbiji dokazuje pozitivne reakcije u 29,8% istraživanih ovnova. Visoka seroprevalencija infekcije ovnova vrstom *B. ovis* uvijek je posljedica nesprovođenja kontrolnih programa duži niz godina (Blasco i Marin, 1990., Bulgin, 1990.).

Nakon epizootiološke ankete u nekim seropozitivnim stadima ovaca izvršili smo klinički pregled serološki pozitivnih ovnova. U trenutku pregleda broj seropozitivnih ovnova je smanjen zbog uginuća ili izlučivanja iz stada. Većina vlasnika je ovnove s otečenjem testisa izlučila iz stada. Kliničkim pregledom adspekcijom i palpacijom epididimisa i testisa 12 ovnova iz 7 seropozitivnih stada, u 5 (41,7%) serološki pozitivnih ovnova utvrđena je asimetrija skrotuma i jednostrano uvećanje repa epididimisa. Promjene u veličini epididimisa kretale su se do veličine kokošnjeg jajeta. Osjetljivost i bolnost epididimisa utvrđena je kod 4 od 5 ovnova s promjenama (80%) i očitovala se je otporom i trzanjem ovnova u tijeku pregleda palpacijom. Temperiranost regije nije ustanovljena. Testisi su bili pokretljivi u skrotalnoj vreći. Epizootiološki podaci ukazuju da se u stadima bolest širila spolnim putem, prilikom prirodnog pripusta. Vlasnici obično primjećuju asimetriju skrotuma, uvećanje epididimisa i testisa u trećine ovnova. U

uzgoje ovnove uvode bez ikakve kontrole, a često ih izmjenjuju između svojih stada čime pospješuju širenje bolesti. Petrović i sur. (2014.) navode u svojim istraživanjima da nakon pripusta nije koncipiralo 24,85% ovaca, što je variralo kod pojedinih stada od 9,09% do 46,86%. Pobacilo je 5,38% ovaca, maksimalno 9,68%. Prosječno se ojanjilo 0,74 janjadi po ovci (od 0,5 do 0,95), a u prvom mjesecu života uginulo je 7,78% janjadi (najviše 29,09%). U stadima ovaca gdje se bolest javila po prvi put nakon pripusta, vlasnici stada prijavili su visok postotak bolesti. Bulgin (1990.) navodi da je dokazano da u novo inficiranim stadima infekcija ovaca sa *B. ovis* dovodi do smanjenja janjenja do 30%, a 15% do 20% u stadima u kojima je bolest endemska.

Tijekom naših istraživanja makroskopskim pregledom epididimisa i testisa patološke promjene koje su ukazivale na infekciju s *B. ovis* utvrđene su u testisima 7 (58.3%) od 12 pretraženih ovnova. Utvrđen je različit stupanj oštećenja koja su karakteristična za akutni i kronični tok bolesti. U prvom slučaju promene su bile nekrotičnog karaktera, a u kroničnom toku uočeni su granulomi, fibroza i atrofija testisa i epididimisa. Karakteristični makroskopski nalaz bio je jednostrani epididimitis u 7 (58,3%) od 12 pregledanih ovnova. Svih 7 ovnova sa uvećanim epididimisom imalo je naznačenu hipertrofiju repa, 4 (33,3%) su imali hipertrofiju tijela, a 2 (16.7%) glave epididimisa. U repu epididimisa dva (16,67%) ovna utvrđena je spermatocela. Pregledom limfnih čvorova nisu utvrđene makroskopske promene.

Denes i Glavits (1994) kronične patološke promjene dokazuju u 60% istraživanih ovnova. Calvalho Junior i sur. (2011.) su trideset dana nakon pokusne infekcijom 9 ovnova sa *B. ovis* u 6 (66,7%) od 9 inficiranih ovnova razvile su se kliničke promene u repu epididimisa, a 5 od 6 ovnova imalo je jednostrane promjene (83,3%). Olsen i Palmer (2016.) u svojim istraživanjima makroskopskim pregledom epididimisa i testisa ovnova patološke promjene koje su ukazivale na infekciju s *B. ovis* najčešće opisuju kao jednostrani epididimitis s hipertrofijom repa, tijela ili glave epididimisa. Dokazano je da se u spermi zaraženih ovnova bez patoloških promjena isto tako može naći *B. ovis* (Swift i sur. 1982.).

Bakteriološkom pretragom obrađeni su uzorci tkiva epididimisa, testisa i limfnih čvorova porijeklom od 26 ovnova. Izdvojeno je 20 izolata (76,9%) od 26 pretraženih serološki pozitivnih ovnova. Picard-Hegen i sur. (2015.) su od 198 uzorkovanih ovnova u 89 (44,95%) izdvojili *B. ovis* i utvrdili su značajnu povezanost ($<0,05$) između rezultata bakteriološke pretrage i kliničkog pregleda. Svi izdvojeni izolati pripadaju rodu *Brucella* i vrsti *Brucella ovis*. Izdvojeni izolati u našem istraživanju su identificirani kao pripadnici

vrste *Brucella ovis* sa identičnim PCR profilom u odnosu na referentni soj *B. ovis* 63/290, što potvrđuje visoku specifičnost metode *multiplex PCR Bruce-ladder*.

Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da je ovčji epididimitis uzrokovao vrstom *B. ovis* rasprostranjen u većini regija u Republici Hrvatskoj. Bolest se širi najčešće nekontroliranim prometom ovnova između ovčara što znatno otežava suzbijanje bolesti. Pristup kontroli infekcije ovnova uzrokovanih vrstom *B. ovis* može se razlikovati u različitim zemljama i područjima, ovisno o mnogim gospodarskim čimbenicima. Iskorjenjivanje bolesti (testiranje i klanje) je najpoželjniji izbor u područjima gdje je to logistički i financijski izvedivo (Ridler i West, 2011., Ridler i sur. 2014.). Ridler i sur. (2014) navode da takav pristup uključuje kombinaciju seroloških (i-ELISA i RVK) i pomoćnih pretraga (klinički pregled) i bakteriološku pretragu sjemenja. Preporuča se da se ovaj vid kontrole primjeni prije svake sezone parenja, kao i prije uvođenja novih ovnova u stado, a koja su slobodna od bolesti. U stadima s visokom prevalencijom bolesti ovakva strategija može biti financijski neodrživa. Postoje dobre naznake u razvoj nove vakcine protiv *B. ovis* koje su testirane na miševima (Sancho i sur. 2014.). Međutim do sada se samo vakcina *B. melitensis* Rev 1 pokazala djelotvornom i u suzbijanju infekcije vrstom *B. ovis* (Blasco, 1990.).

6. Zaključci

Na osnovi provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Našim istraživanjem smo dokazali da je *Brucella ovis* rasprostranjena u uzgojima ovaca u Republici Hrvatskoj, što se podudara s ranijim istraživanjima.
2. Kliničkim pregledom (adspekcijom i palpacijom) u 41,7% serološki pozitivnih ovnova utvrđena je asimetrija skrotuma i uvećanje epididimisa.
3. Tijekom istraživnog razdoblja od 2011. do 2015. godine pretraženo je 18 324 seruma rasplodnih ovnova, a pozitivne reakcije utvrđene su u 1 100 (6%). Od 521 krvi pretražene ovce pozitivne reakcije utvrđene su u 12 (2,3%) krvnih uzoraka ovaca u stadima u kojima su se pojavljivali pobačaji.
4. Makroskopskim pretragama patološkim na testisima ovnova utvrđene su u 58,3% testisa različiti stupnjevimi patoloških promjena.
5. Bakteriološkom pretragom *B. ovis* je izdvojena iz 20 (76,9%) od 26 pretraženih organa ovnova.
6. Molekularnim pretragama utvrđeno je da su svi izdvojeni izolati pripadali vrsti *Brucella ovis*.

7. Literatura

1. Alton, G. G., Jones L. M., Angus R. D., Verger J. M. (1988): Techniques for the brucellosis laboratory. 1 st. Ed., Inra, Paris.
2. Arsenault, J., C. Girard, P. Dubreuil, D. Belanger (2004): Lack of evidence of *Brucella ovis* infection in rams in Qubec. Can. Vet. J. 45, 312 - 314.
3. Bagley, C. V., Paskett M. E., Matthews N.J., Stequist N. J. (1985): Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah. J. Am. Vet. Med. Assoc. 186, 798- 801.
4. Blasco, J. M., Buen L., Estrada J., Garcia J., Llena J., Ortilles A. (1983) Alteraciones testiculares v brucelosis en moruecos de la region aragonesa. Noticias Neosan, 211, 147.
5. Blasco, J. M., Marin C. M. (1990): Brucelosis ovina: Etiologia, diagnostico bacteriologico. Ovis, 8, 15 - 22.
6. Blasco, J. M. (1990): *Brucella ovis*. In: Nielsen, K., J. R. Duncan. Editors. Animal Brucellosis. Boca Raton: CRC Press. P. 351 - 378.
7. Bulgin, M. S., Anderson B. C. (1983): Association of sexual experience *with* isolation of various bacteria *in cases of ovine epididymitis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 182, 372-374.
8. Bulgin, M. S. (1990): *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. Am. Vet. Med. Assoc. 196, 313-315.
9. Burgess, G. W. (1982): Ovine contagious epididymitis: a review. Vet. Microbiol, 7,551- 575.
10. Carvalho Júnior, C. A., Moustacas V. S., Xavier M. N., Costa E. A., Costa L. F., Silva T. M. A, Paixão T. A., Borges A. M., Gouveia A. M. G., Santos R. L. (2011): Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. Small Rum. Res. 102, 213-222.
11. Corbel, M. J., Gill K. P. W., Thomas E. L. (1983): Methods for the identification of *Brucella*. MAFF, CVL New Haw, Weybridge, Surey.
12. Cvetnić, Ž. (2015.): *Brucella ovis*. U: Bruceloza. Medicinska naklada/Hrvatski veterinarski institut. Zagreb. Str.
13. Denes, B., Glavitz R. (1994): Bacteriologically confirmed cases of ovine epididymo-orchitis caused by *Brucella ovis* in Sub- Carpathia. Acta Vet. Hung. 42, 25-33.

14. Dobrean, V., Opris A., Daraban S. (2002): An epidemiological and surveillance overview of brucellosis in Romania. *Vet. Microbiol.* 90, 157-163.
15. Garcia-Yoldi, D., Marin C.M., De Miguel P. M., Munoz P. M., Vizmanos J. L., Lopez-Goni I. (2006): Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin. Chem.* 52, 779-781.
16. Farina, R., Cerri D., Andreani G., Renzoni P., Gaudachini F. & Lombardi G. (1995): Epididimite dei montoni: Prima segnalazione sulla presenza di *Brucella ovis* in Italia. *Sel. Vet.*, 36, 285-291.
17. Ficipal, A., J. Jordana, J. M. Blaco, I. Moriyon (1998): Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small. Rumin. Res.* 29, 13 -19.
18. Hold, F., Zerobin K. (1993): *Brucella ovis* infection in rams of the “white Alp” breed. *Schweiz Arch. Tierheil.* 135, 44-50.
19. Hopkinson, W. I., J. Lloyd, B. M. Micke (1979): *Brucella ovis* in Merimo rams in western Australia. *Aust. Vet. J.* 55, 200-201.
20. Livingstone, C. W., W. T. Hardy (1964): Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. *Am. J. Vet. Res.* 25, 660-665.
21. Kalinovski, A. I, Repina L. P., Innokenteeva T. I. (1995): Brucellosis in Siberia and the Far East. *Med. Parazitol. (Moskva)*, 4, 42-45.
22. Krt B. (1992): Evaluation of similar serological methods for the diagnosis of ovine brucellosis – infection with *Brucella ovis*. Master 's thesis, faculty of Veterinary Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia.
23. Marín, C. M., M. P. Jiménez de Bagüés, J. M. Blasco, C. Gamaso, I. Moriyon, R. Diaz (1989): Comparison of tree serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet. Rec.* 125, 504 - 508.
24. Marin C. M., Alabart J. L., Blasco J. M. (1996): Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 426-428.
25. Niilo L., MacDonald D. W., Godkin G. F., Stone M. W. (1986): Ovine Brucellosis in Alberta. *Can. Vet. J.* 27, 245-249.
26. OIE (World Organisation for Animal Health) (2014): Ovine epididymitis (*Brucella ovis*).In: OIE, editor. *Manuall of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris, France.

27. Olsen, S. C., M. V. Palmer (2016): Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 year. Vet. Pathol. 51, 1076-1089.
28. Petrović, M. (2012): Utvrđivanje prisustva infekcije ovnova sa vrstom *Brucella ovis* i predlog dijagnostičkog protokola ispitivanja. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet Novi Sad - Departman za veterinarsku medicinu.
29. Petrović, M., S. Špičić, A. Potkonjak, B. Lako, M. Kostov, Ž. Cvetnić (2014): First evidence of *Brucella ovis* infection in ram sin the Pirot Municipaly, Serbia. Vet. Ital. 50, 259 - 268.
30. Picard-Hagen, N., X. Berthelot, J. L. Champion, L. Eon, F. Lyazrhi, M. Marois, M. Peglion, A. Schuster, C. Trouche, B. Garin-Bastuji (2015): Contagious epididymitis due to *Brucella ovis*: relationship between sexual function, serology and bacterial shedding in semen. BMC Vet. Res. 125, 2 - 7.
31. Rahaley, R. S., S. M. Dennis (1984): Histopathology of experimental brucellosis in rams following vaccination with *Brucella ovis*. Aust. Vet. J. 61, 353-356.
32. Ridler, A. L., M. West (2011): Control of *Brucella ovis* infection in sheep. Vet. Clin. N. Am. Food A. 27, 61-66.
33. Ridler, A. L., S. L. Smith, D. M. West (2014): Seroconversion and semen shedding in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. N. Z. Vet. J. 62, 47-50.
34. Sancho, P., C. Tejedor, R. S. Sidhu- Munoz, L. Fernandez-Lago, N. Viscaino (2014): Evaluation in mice of brucella ovis attenuated mutans for use as live vaccines against *B. ovis* infection. Vet. Res. 45, 61.
35. Schöpf K., Khaschabi D. (1997): Experiences in the eradication of *Brucella ovis* infections in sheep in Tyrol. Tierarztl. Prax. Ausg G Grosstiere Nutztiere 5, 413-416.
36. Sergeant, E. S. (1994): Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in commercial ram flock int he Tamwort area. N. Z. Vet. J. 42, 97-100.
37. Serpe L., Gallo P., Fidanza N., Scaramuzzo A., Fenizia D. (1999): Single-step method for rapid detection of *Brucella spp.* in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. J. Dairy Res. 66, 313-317.
38. Swift, B. L., F. Craddock, H. A. Hancock (1982): Ram epididymitis: a clinical report. Theriogenology, 17, 343-347.

39. Špičić, S. (2005): Rasprostranjenost infekcije vrstom *Brucella ovis* u ovaca – serološka, patomorfološka i molekulska istraživanja. Magistarski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
40. Špičić, S., Marjanović S., Zdelar-Tuk M., Cvetnić Z. (2009): First evidence of *Brucella ovis* infection in Republic of Croatia. Dtsch. Tierär. Wochen. 116, 209-213.
41. Špicić S., Marjanović S., Zdelar-Tuk M., Cvetnić Z. (2010): Serological, bacteriological and molecular diagnosis of brucellosis in domestic animals in Croatia. Cro. Med. J. 51, 320-326.

8. Sažetak

U razdoblju od 2011. do 2015., godine istražena je rasprostranjenost infekcije vrstom *B. ovis* u ovnova u Republici Hrvatskoj. U istraživanom razdoblju ukupno je pretraženo 18 324 seruma rasplodnih ovnova, a pozitivne reakcije su utvrđene u 1100 (6%) uzoraka. Od 521 seruma pretraženih ovaca, pozitivne reakcije utvrđene su u 12 (2,3%). Kliničkim pregledom adspekcijom i palpacijom testisa i epididimisa u 41,7% serološki pozitivnih ovnova utvrđena je asimetrija skrotuma i jednostrano uvećanje repa epididimisa. Patomorfološkim pregledom vidljive promjene poput granuloma, fibroze i atrofija testisa i epididimisa utvrđene su u 58,3% pretražena testisa ovna. Bakteriološkom pretragom iz uzoraka testisa i epididimisa ovnova izdvojeno je 20 (76,9%) izolata iz 26 pretraženih ovnova. Svih 20 izolata molekularnim metodama identificirano je kao vrsta *B. ovis*. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da je zarazni epididimitis uzrokovan vrstom *B. ovis* rasprostranjen u većini istraživanih regija u Republici Hrvatskoj.

9. Summary

The prevalence and the possibility of diagnosis of infection caused by species *Brucella ovis* in sheep in Croatia

In the period from 2011 to 2015, we examined the prevalence of infection by *B. ovis* in rams in the Republic of Croatia. In the period of examination, a total of 18,324 serum samples breeding rams, positive reactions were established in 1100 (6%) samples. Of the 521 sera examined sheep, positive reactions were found in 12 (2.3%). Clinical examination, palpation and adspection testes and epididymis in 41.7% seropositive rams established the asymmetry of the scrotum and unilaterally increase the tail of the epididymis. Pathological examination such as granulomas, fibrosis and atrophy of the testes and epididymis were found in 58.3% searched ram testicles. Bacteriological examination testicular and epididymal samples from rams, *B. ovis* isolated in 20 (76.9%) from 26 searched rams. All 20 isolates by molecular methods have been identified as species *B. ovis*. Based on the our results, it is evident that the infectious epididymitis caused by *B. ovis* the most prevalent in the investigated region in the Republic of Croatia.

10. Životopis

Rođena sam 30. ožujka 1991. u Zagrebu. Osnovnu školu završila sam u Velikoj Mlaci, a srednju na Zdravstvenom učilištu u Zagrebu. Godine 2010. upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, a apsolvirala sam 2016. godine. Tijekom studija sudjelovala sam u različitim aktivnostima kao što je izrada studentskog rada na Zavodu za reprodukciju i porodništvo Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Na Zavodu za prehranu i dijetetiku životinja Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu sudjelovala sam u izvođenju pokusa, a u okviru znanstvenog projekta. Članica sam studentske udruge IVSA u kojem sam obnašala ulogu koordinatora za razmjenu studenata, te sam članica akademskog zbora »Ab Ovo«. Tečno govorim engleski i njemački jezik. Ponosna sam majka i supruga.

Koautorica sam sljedećih stručnih radova:

1. Stepanić, M., M. Benić, B. Habrun, G. Kompes, L. Cvetnić, **M. Perković** (2014): Uzročnici mastitisa niske pojavnosti. Vet. Stn. 45, 41 - 47.
2. Cvetnić, Ž., T. Kiš, T. Bedeković, S. Špičić, M. Agičić, **M. Perković**, M. Benić (2014): Najvažnije zarazne bolesti mliječnih goveda- proširenost i nadzor u RH. Simpozij mljekarskih stručnjaka, Lovran, 9. - 12. studenog 2014.

